KONSERVIERUNG ISOLIERTER RATTENLEBERN DURCH HÄMOGLOBINFREIE HYPOTHERME LANGZEITPERFUSION

Untersuchungen über den Einfluß zweier verschiedener Konservierungstemperaturen und zweier Lösungen verschiedener Osmolarität auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Harnstoffsynthese als Vitalitätsparameter

Joachim F. R. Kosterhon

Diss
München
1984

Aus der Kinderchirurgischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Ch. Hecker)
der Universitäts-Kinderklinik
München
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital

KONSERVIERUNG ISOLIERTER RATTENLEBERN DURCH HÄMOGLOBIN-FREIE HYPOTHERME LANGZEITPERFUSION

Untersuchungen über den Einfluß zweier verschiedener Konservierungstemperaturen und zweier Lösungen verschiedener Osmolarität auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Harnstoffsynthese als Vitalitätsparameter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
des Fachbereiches Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Joachim F. R. Kosterhon
aus Landshut

München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. F. Zimmermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W.Ch. Hecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen lieben Eltern

und Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINFÜHRUNG	1
2.	FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPROGRAMM	4
2.1.	Fragestellung	4
2.2.	Versuchsprogramm	7
3.	MATERIAL UND METHODIK	8
3.1.	Die hämoglobinfreie Leberperfusion	8
3.2.	Versuchsaufbau	9
3.2.1.	Perfusionsapparatur	9
3.2.2.	Oxygenierung und Temperierung	13
3.3.	Perfusionsmedien	16
3.3.1.	Normoosmolare Perfusionslösung	16
3.3.2.	Hyperosmolare Perfusionslösung	18
3.4.	Tiermaterial	18
3.5.	Isolierung der Rattenleber	19
3.5.1.	Die Narkosetechnik	19
3.5.2.	Die Präparationstechnik	19
3.6.	Versuchsdurchführung	24
3.6.1.	Normotherme Kurzzeitperfusion	24
3.6.2.	Hypotherme Kurzzeitperfusion	25
3.6.3.	Hypotherme Langzeitperfusion	27
4.	AUSWERTUNG	3o
4.1.	Die photometrische Harnstoffmessung	3o
4.1.1.	Physikalisch-mathematische Grundlagen	3o
4.1.2.	Biochemische Grundlagen	31
4.1.3.	Praktische Durchführung der Messung	33

		Seite
4.2.	Die Temperaturabhängigkeit der Harnstoffproduktion	36
4.2.1.	Die ARRHENIUS-Gleichung	36
4.2.2.	Die graphische Darstellung	38
4.2.3.	Die Berechnung der Regressionsgeraden	4o
4.2.4.	Der Faktor "Q_{1o}"	43
4.2.5.	Die Aktivierungsenergien	44
5.	VERSUCHSERGEBNISSE	45
5.1.	Stoffwechseluntersuchungen	45
5.1.1.	Die normotherme Harnstoffsynthese	45
5.1.1.1.	Stimulierung mit Lactat und Pyruvat	46
5.1.1.2.	Stimulierung mit Lactat, Pyruvat und Ornithin	5o
5.1.2.	Die hypotherme Harnstoffsynthese	63
5.2.	Konservierungsversuche	72
5.2.1.	Normoosmolare Langzeitperfusion bei 4°C	73
5.2.2.	Normoosmolare Langzeitperfusion bei 11°C	77
5.2.3.	Hyperosmolare Langzeitperfusion bei 4°C	8o
5.3.	Zusammenfassende Ergebnisbetrachtung	84
6.	DISKUSSION	89
6.1.	Der Wert Q_{1o} und die Aktivierungsenergie E_a	89
6.2.	Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} als Vitalitätsparameter	93
6.3.	Leberzellschwellung und Hyperosmolarität	96
7.	ZUSAMMENFASSUNG	1o1
8.	LITERATURNACHWEIS	1o2

1. EINFÜHRUNG

Im Zuge des heutigen wissenschaftlichen Fortschritts gewinnt die Organtransplantation mehr und mehr an Bedeutung für die Behandlung irreversibler entzündlicher, toxischer und traumatischer Schädigungen lebenswichtiger Organe. Dank modern ausgestatteter und organisierter Transplantationszentren konnte die Nierentransplantation bereits zu einem fast routinemäßigen Verfahren entwickelt werden. Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit sich die Transplantation auch bei anderen Organen wie Pankreas und Leber erfolgreich anwenden läßt. Überbrückungsmaßnahmen als temporärer oder endgültiger Ersatz funktionsuntüchtiger Organe sind derzeit nur im Bereich der Niere bzw. des Pankreas durch Dialyse bzw. Enzym- und Hormonsubstitution möglich. Somit nimmt die Leber diesbezüglich eine Sonderstellung ein, da einem Patienten mit irreversibler Leberschädigung nur durch sofortige Implantation einer gesunden Leber ein Weiterleben ermöglicht werden kann. Dies setzt jedoch eine schnelle Verfügbarkeit über eine blutgruppenkompatible Spenderleber voraus. Da eine Direkttransplantation unter Berücksichtigung eben genannter Gesichtspunkte nur in den seltensten Fällen möglich ist, ergibt sich zwangsläufig die Frage nach einer praktikablen Leberkonservierung.

Als äußerst stoffwechselaktives Organ besitzt die Le-

ber eine nur geringe anoxische Toleranz. Wird sie bei 37°C länger als 15 Minuten ohne normoxische Perfusion belassen, erleidet sie einen irreversiblen Schaden (CALNE, 1968). Als brauchbare Methode zur Minderung der metabolischen Aktivität hat sich die derzeit übliche einfache hypotherme Lagerung nach initialer Auswaschperfusion erwiesen, da bei Temperaturen von 7°C - 1o°C der Sauerstoffverbrauch auf ca. 3 - 6% der Norm reduziert werden kann (GRUNDMANN et al., 1978). Eine normotherme Leberkonservierung mit Blut hat sich als insuffizient erwiesen (CALNE, 1972). Über die bis jetzt längsten erfolgreichen Konservierungszeiten durch hypotherme Lagerung menschlicher Lebern mit 1o bzw. 1o,5 Stunden berichteten BENICHOU et al. (Denver, 1977) bzw. ZIMMERMANN et al. (Cambridge, 1978). Hierzu wurden die Lebern in situ mit Ringer-Lactat-Lösung (Denver) oder HARTMANN-Lösung ausgespült und nach erfolgter Spenderhepatektomie mit COLLINS-Lösung oder Plasma-Lösung (Cambridge) hypotherm gelagert. Als limitierende Faktoren dieser Konservierungstechnik sind der nicht gedeckte Bedarf an Substrat, Energieträgern und Sauerstoff sowie der fehlende Abtransport saurer Metaboliten zu nennen. Eine Verlängerung der Ischämiezeiten auf 14 - 15 Stunden konnte durch hypotherme Lagerung mit intermittierender Schwerkraftperfusion erreicht werden (CALNE, 1972; LIE et al., 1974).

Somit erhebt sich die Frage, inwieweit nicht durch hypotherme Dauerperfusion den Erfordernissen des zu konser-

vierenden Organs eher Rechnung getragen werden könnte, da hierdurch eine Versorgung mit Substraten sowie der Abtransport von Metaboliten gewährleistet wären. Die längste bislang mitgeteilte Konservierungszeit mit 48 Stunden konnte von SUNG und WOODS (1974) mit o.g. Technik unter Verwendung frisch gefrorenen homologen Plasmas erzielt werden.

Wir versuchten, die Technik der hypothermen Dauerperfusion auf die Konservierung isolierter Rattenlebern anzuwenden, wobei wir nicht die erfolgreiche Transplantation als Bewertungsmaßstab für die Vitalität der konservierten Leber wählten (ABOUNA et al., 1971; BRETTSCHNEIDER et al., 1968; DE MIGUEL et al., 1974), sondern diese mit Hilfe der Messung von Stoffwechselaktivitäten zu beurteilen versuchten.

2. FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPROGRAMM

2.1. Fragestellung

Es ergab sich das Problem, mit möglichst wenigen, aber aussagekräftigen Parametern die Vitalität der Leber nach erfolgter Konservierung beurteilen zu können. Hierfür bot sich als empfindlicher Indikator die Harnstoffsynthese an. Da dieser zyklische Vorgang zur einen Hälfte intra-, zur anderen Hälfte extramitochondrial vollzogen wird - wie seit Erforschungen durch KREBS und HENSELEIT (1932) bekannt ist -, gingen wir davon aus, daß sich eine Schädigung der Leberzellen, sei es nun an der Zellmembran, im Zytoplasma oder an den Mitochondrien, am Abfall der Harnstoffsyntheseleistung zeigen würde. Daher entschieden wir uns für die stimulierte Harnstoffsynthese in der Rattenleber nach SCHOLZ (1979) mit NH_4Cl als Substrat.

Um bei den Konservierungsexperimenten zu verwertbaren Aussagen gelangen zu können, galt es zuerst, die Reaktionskinetik der Harnstoffsynthese in der Rattenleber bezüglich Temperaturänderungen und Maximalgeschwindigkeiten aufzuklären.

Wie in der Einleitung schon erwähnt, erweist sich die hypotherme Lagerung des zu transplantierenden Organs nach dem derzeitigen Stand der Forschung als einzig praktikable Konservierungstechnik. Die dadurch

erzielte Stoffwechseldrosselung hat nun aber eine ödematöse Schwellung der Leberzellen zur Folge, bedingt durch den Ausfall der Na^+-K^+-Ionenpumpe. Das hierfür verantwortliche Enzym, die Na^+-K^+-ATPase, ist organspezifisch temperaturempfindlich (MARTIN et al., 1972). In den Leberzellen läßt sich unterhalb einer Temperatur von 1o°C keine diesbezügliche Enzymaktivität mehr nachweisen. Diese Tatsache führt zu einer Ionenverschiebung von K^+, Na^+ und Mg^{++} entlang des natürlichen Konzentrationsgradienten. Große Mengen von Kalium und Magnesium diffundieren aus der Zelle in den Extrazellulärraum, woraus ein Natrium- und damit gekoppelter Wassereinstrom in die Zelle resultiert (BRENDEL et al., 1966; GRUNDMANN et al., 1978). Dieser ödematösen Zellschwellung mit resultierender intrahepatischer Vasokompression versucht man auf zwei Wegen entgegenzuschreiten. Durch Verwendung von hyperosmolaren Lösungen soll der Wassereinstrom in die Zelle reduziert werden. Als osmotisch wirksame Komponenten wurden hierfür Glukose, Succrose und Mannitol u.a. verwendet. Andererseits wurden Experimente mit Lösungen durchgeführt, deren ionale Zusammensetzung der des Zytoplasmas gleichgesetzt wurden. COLLINS et al. (1969) und SACKS et al. (1973) haben hierfür kaliumreiche und natriumarme Lösungen entwickelt, wobei COLLINS Glukose und SACKS Mannitol als zusätzliche osmotisch wirksame Komponenten hinzugefügt haben.

Untersuchungen von CAHILL et al. (1958) haben gezeigt, daß Glukose leicht in die Leberzellen zu penetrieren

vermag - im Gegensatz zu Nierenzellen -, während z.B. Succrose nur sehr langsam in die Hepatozyten eindiffundiert (WILLIAMS et al., 1971). Somit ist der osmotische Effekt der Glukose bezüglich der Leberkonservierung niedriger einzustufen. Allerdings soll sich der Zusatz von Glukose für den Erhalt der Glykogenreserven in der Leber als fördernd erweisen (PONTEGNIE-ISTACE und LAMBOTTE, 1977).

Die o.g. Lösungen sind vorwiegend für die hypotherme Organlagerung konzipiert. Wir versuchten jedoch, Rattenlebern durch hypotherme Dauerperfusion vital zu erhalten. Somit verwendeten wir ein Perfusionsmedium, das bezüglich der ionalen Zusammensetzung der des Blutes entspricht, um unsere Experimente so nahe wie möglich den in vivo Verhältnissen anzupassen. Um der ödematösen Zellschwellung entgegenzuwirken, wurden hyperosmolare Konservierungsversuche bei 4°C und normoosmolare Versuche bei 11°C mit entsprechenden Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

Unseres Wissens wurden noch keine diesbezüglichen Untersuchungen angestellt.

2.2. Versuchsprogramm

A) Stoffwechseluntersuchungen

a) Bestimmung der maximalen Harnstoffsynthesegeschwindigkeit bei Normothermie unter Stimulierung mit Lactat und Pyruvat

b) Bestimmung der maximalen Synthesegeschwindigkeit bei Normothermie unter Stimulierung mit Lactat, Pyruvat und Ornithin

c) Bestimmung der nötigen Dauer der Auswaschperfusion

d) Bestimmung der zur Erreichung der maximalen Synthesegeschwindigkeit nötigen Perfusionsdauer

e) Aufklärung der Temperaturabhängigkeit der stimulierten Harnstoffsynthese durch kontinuierliche Abkühlung und sofortige Wiedererwärmung

B) Konservierungsuntersuchungen

a) 24-Stunden-Langzeitperfusion mit normoosmolarer KREBS-HENSELEIT-Lösung bei 4°C

b) 24-Stunden-Langzeitperfusion mit normoosmolarer K-H-Lösung bei 11°C

c) 24-Stunden-Langzeitperfusion mit hyperosmolarer K-H-Lösung (4oo mM) durch Zusatz von 9o mMol/l Mannitol bei 4°C

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Die hämoglobinfreie Leberperfusion

Über die ersten Stoffwechseluntersuchungen an isolierten und perfundierten Rattenlebern wurde von COREY und BRITTON (1941) sowie von TROWELL (1942) berichtet. Sie benützten, ebenso wie MILLER et al. (1951), heparinisiertes Rattenblut als Perfusionsmedium. SCHIMASSEK (1962) hingegen bediente sich eines halbsynthetischen Perfusates, indem er einer Tyrode-Lösung gewaschene Rindererythrozyten und gereinigtes Rinder-Serumalbumin zusetzte. In seinen Experimenten ermittelte er einen Bedarf an Sauerstoff von o,o5 ml O_2 pro Minute und pro Gramm Lebergewebe. Die Leberperfusion ohne Verwendung jeglicher Sauerstoffträger wurde erstmals von SCHOLZ und BÜCHER (1965, 1967) durchgeführt, wobei sie eine isotone Salzlösung mit 7%igem Dextran-Zusatz als Perfusionsmedium benützten. Die Oxygenierung erfolgte durch physikalische Aufsättigung des Perfusates im Gegenstromprinzip mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd. Der hiermit erzielte Sauerstoffpartialdruck in der Perfusionslösung betrug bei einem mittleren Atmosphärendruck von 725 mmHg und bei 37°C 635 - 645 mmHg. Unweigerliche Sauerstoffverluste im Schlauchsystem reduzierten den pO_2 auf einen Wert von ca. 6oo mmHg unmittelbar vor der Leberpforte, was einer Sauerstoffmenge von o,o18 ml pro ml Perfusat entsprach. Durch eine

Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit auf 3 - 4 ml/min pro Gramm Lebergewebe (physiologischer Wert: 1 ml/min/g) konnte somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Rattenleber bei 37°C erzielt werden (SCHOLZ, 1967).

Wir führten die Perfusion nach SCHOLZ in etwas modifizierter Form an isolierten Rattenlebern durch. Obwohl das Organ aus dem Organismus des Tieres gelöst war, entsprachen das Kreislaufprinzip und die morphologische Organisation den Verhältnissen in vivo (ZIMMER, 1973). Die Leber war jetzt den neuralen, humoralen und metabolischen Einflüssen des Gesamtkörpers entzogen, wodurch gut reproduzierbare Experimente ermöglicht wurden. Die physiologischen Verhältnisse wurden mit gewissen Einschränkungen (s.o.) beibehalten, um so die Versuchsbedingungen bestmöglichst den in vivo Verhältnissen anzugleichen.

3.2. Versuchsaufbau

3.2.1. Perfusionsapparatur

Für die nachstehend aufgeführten Experimente wurde ein nichtrezirkulierendes, d.h. offenes Perfusionsmodell benützt, wobei die isolierte Rattenleber volumenkonstant durchströmt wurde. Diese Apparatur ließ eine Perfusion mit konstanter Substrat- und Sauerstoffzufuhr

sowie eine exakte Bestimmung der arterio-venösen Differenz verschiedener Stoffwechselmetaboliten zu. Nachteile dieses Systems waren in der unphysiologischen Druckerhöhung (drei- bis vierfache physiologische Perfusionsgeschwindigkeit) mit resultierender interstitieller Ödembildung und in dem hohen Perfusataufgebot (insbesondere im Hinblick auf die Perfusion menschlicher Organe) zu finden.

Im Prinzip wurde die von SCHOLZ (1967) beschriebene Apparatur mit der von KÖHLER (1979) entwickelten Perfusionskammer verwendet. Für unsere Untersuchungen mußten noch geringfügige Änderungen vorgenommen werden. Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht.

Aus dem Vorratsgefäß (A) wird das Perfusat mittels einer regelbaren Schlauchpumpe (C) durch einen Schwebstoffilter (B) gesaugt und über einen Dreiwegehahn (D) in einen der beiden Oxygenatoren gepumpt. Mit Hilfe des Dreiwegehahnes kann die Perfusionslösung entweder durch den variabel temperierbaren Oxygenator (E) ober durch den konstant auf 37°C temperierten Oxygenator (F) geleitet werden. Über einen mehrfach isolierten und kurz gehaltenen Schlauch gelangt die Lösung in die ebenfalls temperierbare Perfusionskammer, wo kurz vor der Organdurchströmung in der Blasenfalle (H) eventuelle Gasblasen abgefangen werden und mittels eines Temperaturgebers (J) kontinuierlich die arteri-

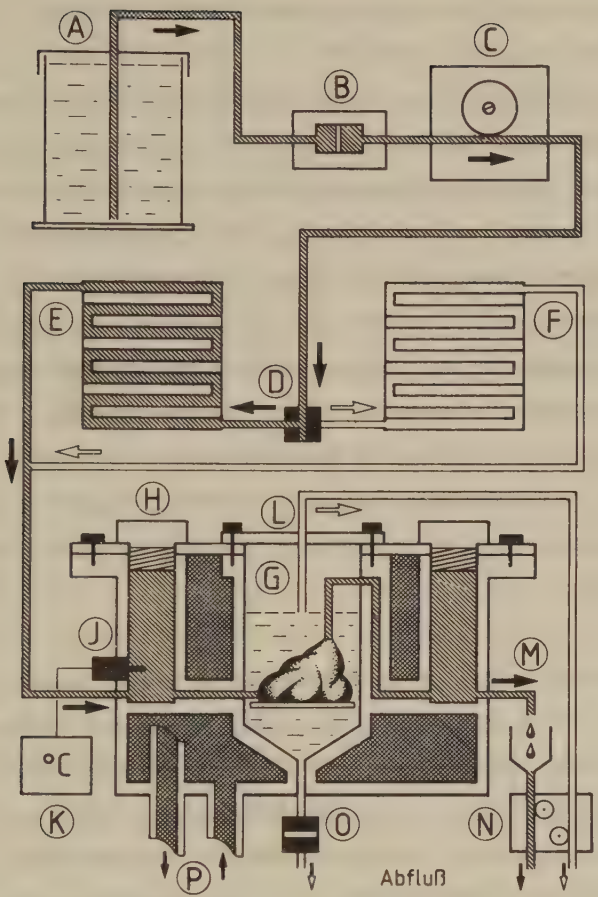


Abb. 1 Versuchsaufbau zur Leberperfusion
(Beschreibung siehe Text)

(A) Perfusat-Vorratsgefäß, (B) Schwebstoffilter, (C) Pumpe, (D) Dreiwegehahn, (E) Oxygenator, (F) Oxygenator, (G)Organkammer, (H) Blasenfalle, (J) Temperaturgeber, (K) Thermometer, (L) Überlaufsystem, (M) Auffanggefäß, (N) Absaugpumpe, (O) Absperrhahn, (P) Kammertemperierung

elle Perfusattemperatur registriert werden kann (K). Im Inneren der Kammer befindet sich die - nur bei Kälte schwimmend gelagerte - Rattenleber (G). Der Absperrhahn (O) dient zum Ablassen der Lagerungsflüssigkeit bei Wiedererwärmung, und durch das Überlaufsystem (L) wird der Flüssigkeitsspiegel in der Kammer auf konstanter Höhe gehalten. Die Perfusionskammer wird mit der gleichen Flüssigkeit temperiert (P) wie der sich gerade in Betrieb befindende Oxygenator. Aus der Kammer tropft dann das venöse Perfusat in ein Auffanggefäß (M), wobei die Perfusionsgeschwindigkeit ermittelt und Meßproben entnommen werden. Eine weitere Schlauchpumpe saugt die Lösung ab und pumpt sie in den Abfluß (N).

Für eine gleichmäßige Leberdurchströmung bis in die Leberperipherie ist ein venöser Druck von 3 - 5 cm H_2O erforderlich. Wie in Untersuchungen von SCHOLZ (1967) gezeigt werden konnte, entsteht durch einen freien Abfluß des Perfusates aus der Lebervene ein Sog, der Zentralisationserscheinungen mit resultierender peripherer Minderperfundierung nach sich zieht. Zur Vermeidung dieses Phänomens wurde im venösen Schenkel der Perfusionskammer eine adäquate Flüssigkeitssäule aufgebaut (siehe Abb. 1), was bei länger dauernden Perfusionen zu einer ödematösen Organschwellung führte (siehe auch Abschnitt 6.3.).

3.2.2. Oxygenierung und Temperierung

Zur Aufsättigung des Perfusates mit Sauerstoff wurden Diffusions-Schlauchoxygenatoren verwendet, die einen temperierbaren Aluminiumkern besaßen. Um diesen war ein Silikon-Kautschukschlauch in einer Länge von ca. 2o m (Durchmesser 3 mm) in fünf Lagen gewunden. Dieser Aluminiumblock war in einen Acrylatzylinder eingelassen. Durch dieses System wurden zwei Kompartimente geschaffen, wobei das den Schlauch durchströmende Perfusat durch die gaspermeable Schlauchwand von dem außerhalb zirkulierenden Gasgemisch (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd) räumlich getrennt wurde. Bei Durchflutung des Schlauches wurde so die Perfusionslösung mit dem von außen eindiffundierenden Gasgemisch bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 3o - 4o ml/min (37°C) bzw. 4 - 8 ml/min (4°C und 11°C) physikalisch nahezu vollständig abgesättigt (siehe Abbildung 2). Die von SCHOLZ et al. (1973) angegebene Dimension der Oxygenatoren wurde auf eine annähernd doppelte Schlauchlänge erweitert.

Für die Temperierung der Perfusionskammer sowie der beiden Oxygenatoren und damit der Perfusionslösung benützten wir zwei miteinander gekoppelte Systeme (siehe Abbildung 2).

Über das Thermosystem (A) wurde mittels Temperaturgeber (B) der Oxygenator (F) konstant auf 37°C eingepegelt. Die Temperatur des Oxygenators (E) konnte über das Thermosystem (C) beliebig zwischen o°C und 4o°C mit Hilfe des Temperaturgebers (D) variiert werden, wobei dieser noch mit einem Programmgeber gekoppelt war, der ein kontinuierliches Abkühlen bzw. Erwärmen innerhalb eines definierten Zeitintervalles ermöglichte. Über die Dreiwegehähne (G) konnte die Perfusionskammer (P) wahlweise in den Kreis eines der beiden Thermosysteme geschaltet werden.

Diese Anordnung gestattete einen Temperatursturz innerhalb weniger Minuten, wie er für die 24-Stunden-Konservierungsversuche als notwendig erachtet wurde. Dazu wurde das anfänglich durch den 37°C warmen Oxygenator (F) strömende Perfusat über den Dreiwegehahn (D) (in Abb. 1) in den auf 4°C bzw. 11°C vorgekühlten Oxygenator (E) umgeleitet; gleichzeitig mußte die Temperierung der Perfusionskammer von System (A) auf System (C) umgeschaltet werden.

Da bei den 4°C-Konservierungsversuchen das Thermosystem (C) wegen unweigerlichen Temperaturverlusten auf ca. o°C eingestellt werden mußte, wurde als Temperierflüssigkeit ein Gemisch aus Wasser und Äthanol verwendet, um einem eventuellen Einfrieren vorzubeugen.

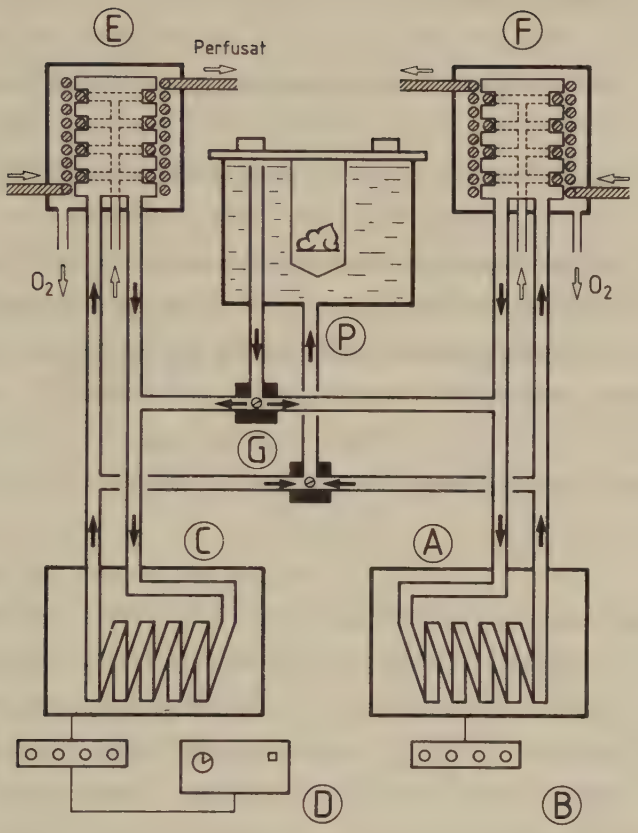


Abb. 2 Oxygenierung und Temperierung der Perfusionslösung (Beschreibung siehe Text)

(A) Konstantes Thermosystem 37°C
(B) Dazugehöriger Temperaturgeber
(C) Variables Thermosystem o°C - 4o°C
(D) Temperatur- und Programmgeber
(E, F) Oxygenatoren, (P) Perfusionskammer
Die Perfusionskammer kann wahlweise einem der beiden Kreise zugeschaltet werden (G).

3.3. Perfusionsmedien

3.3.1. Normoosmolare Perfusionslösung

Für unsere Experimente wurde eine von KREBS und HENSELEIT (1932) angegebene Elektrolytlösung gewählt, die keine kolloid-osmotisch wirksamen Substanzen enthält. Zur Konstanthaltung des pH von 7,4o wurde ein Bikarbonatpuffer, bestehend aus 25 mM $NaHCO_3$ und 5% CO_2 (pCO_2= = 35 mmHg), verwendet (SCHOLZ, 1967).

Die verwendeten Salzkonzentrationen im Perfusat:

NaCl	115,oo mM	(MG = 58,44)
$NaHCO_3$	25,oo mM	(MG = 84,o1)
KCl	5,9o mM	(MG = 74,96)
$MgCl_2 \times 6H_2O$	1,2o mM	(MG = 2o3,31)
Na_2SO_4	1,2o mM	(MG = 142,o4)
$CaCl_2 \times 2H_2O$	2,5o mM	(MG = 147,oo)
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	1,24 mM	(MG = 138,o1)

Die Ionenverteilung nach vollständiger Dissoziation:

Na^+	144,oo mval	Cl^-	128,oo mval
K^+	5,9o mval	HCO_3^-	25,oo mval
Ca^{++}	5,oo mval	$H_2PO_4^-$	1,24 mval
Mg^{++}	2,4o mval	SO_4^{--}	2,4o mval

Somit entspricht die ionale Zusammensetzung der K-H-Lösung in etwa der des Blutes. Die theoretische Osmolarität beträgt 3o9 mM, die gemessene Osmolalität (Osmometer, Fa. Knauer, Oberursel/Ts.) lag bei ca. 275 mosmol/kg (pH = 7,4o).

Nach vollständiger Auflösung der o.g. Salze in bidestilliertem Wasser wurde das erhaltene Perfusat durch Titration mit HCl bzw. NaOH auf den pH-Wert von 7,4o eingestellt. Die daraus resultierenden eventuellen Änderungen der Ionenzusammensetzung wurden jedoch wegen ihrer Geringfügigkeit nicht berücksichtigt.

Um sich nun bei den unten angeführten Versuchen der Harnstoffsynthese als Leberfunktionsparameter bedienen zu können, wurde der K-H-Lösung Ammoniumchlorid in einer Konzentration von 1 bzw. 2 mMol/l als Substrat zugesetzt, wodurch die für die Erreichung der maximalen Synthesegeschwindigkeit nötige Substratsättigung gewährleistet war (SCHOLZ, 1979). Zusätzlich wurden noch Lactat, Pyruvat und Ornithin in verschiedenen Konzentrationen zur Stimulierung der Syntheseleistung beigemengt (SCHOLZ, 1979).

3.3.2. Hyperosmolare Perfusionslösung

Um der schon erwähnten Zellschwellung unterhalb einer Konservierungstemperatur von ca. 1o°C entgegenzuwirken, wurde bei einer Versuchsreihe der K-H-Lösung die stoffwechselindifferente, aber osmotisch wirksame Substanz Mannitol beigegeben. Durch Zugabe von 9o mMol/l konnte die theoretische Osmolarität des Perfusionsmediums auf 4oo mM erhöht werden, wobei die gemessene Osmolalität bei ca. 36o mosmol/kg (pH = 7,4o) lag.

3.4. Tiermaterial

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Wistar-II-Ratten (Fa. Thomae, Biberach) verwendet. Ihr Gewicht betrug im allgemeinen zwischen 16o und 2oo g. Ernährt wurden die Tiere mit "Altromin" Standardfutter (Fa. Altromin, Lippe, Westfalen) und Wasser ad libitum. Zur Bestimmung der Lebermasse wurde das narkotisierte Tier unmittelbar vor der Leberpräparation auf 5 g genau gewogen. Da bei Albinoratten das Lebergewicht 4% des Körpergewichtes beträgt (HAGEMANN und SCHMIDT, 196o), konnte somit die Lebermasse auf einfache Weise ermittelt werden.

3.5. Isolierung der Rattenleber

3.5.1. Die Narkosetechnik

Zur Narkoseeinleitung wurde die Ratte in einen luftdichten Glasbehälter (Volumen ca. 2o 1), der mit Ätherdampf gesättigt war, eingebracht. Nach Eintritt der Bewußtlosigkeit wurde das Tier gewogen und anschließend mittels Pflasterstreifen in Rückenlage auf einem Präparationstisch fixiert. Zur Weiterführung der Narkose bedienten wir uns einer aus einer 2o-ml-Einmalspritze gefertigten Atemmaske, die der Ratte über die Schnauze gestülpt werden konnte. Hierzu wurde der Spritzenkonus über einer Flamme verschweißt, das Innere der Spritze zur Hälfte mit Verbandsmull ausgefüllt und dieser reichlich mit Narkoseäther durchtränkt. Durch Vorschieben oder Zurückziehen der Atemmaske konnte auf einfache Weise die Narkosetiefe beliebig gesteuert werden. Der Äthervorrat in der Maske reichte für ca. eine Stunde.

3.5.2. Die Präparationstechnik

Nach völliger Relaxation der narkotisierten Ratte wurde mit einem Medianschnitt das Abdomen bis zum Processus xyphoideus eröffnet und beiderseits mit einem nach kranial-lateral verlaufenden Entlastungsschnitt freigelegt (siehe Abbildung 3).

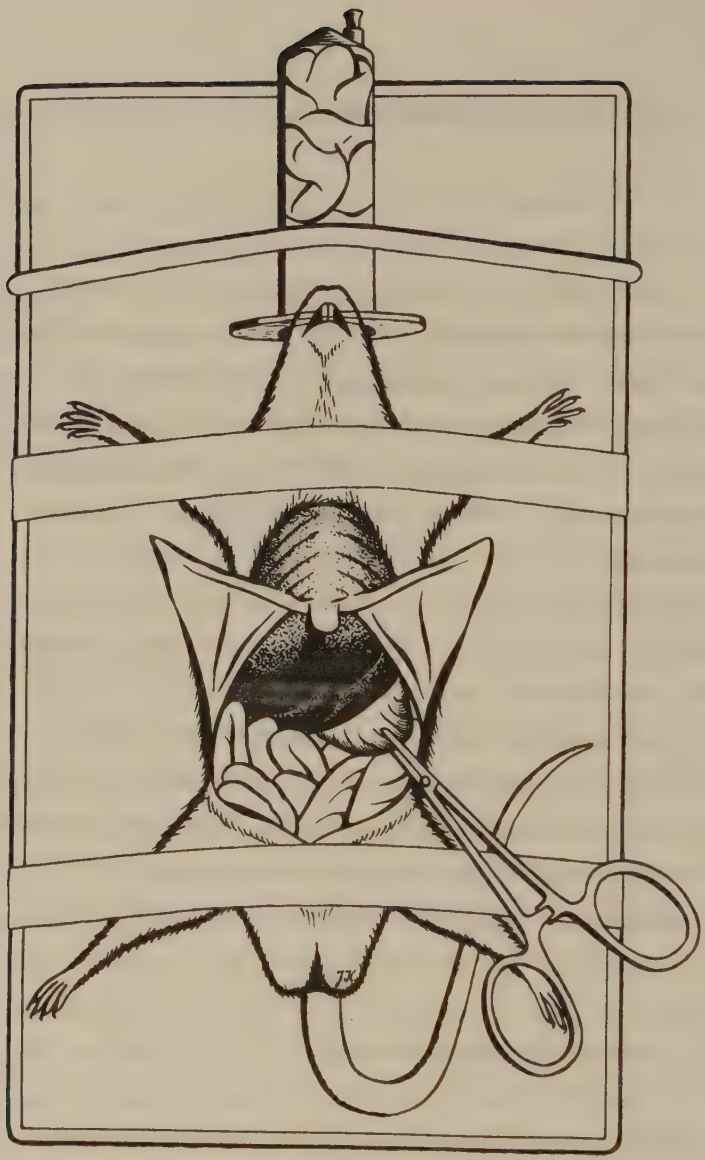


Abb. 3 Fixation der narkotisierten Ratte auf dem Präparationstisch mittels Pflasterstreifen (Abdomen vollständig eröffnet, Lebersitus freigelegt, Magen nach kaudal gezogen)

Der Magen wurde an der großen Kurvatur angeklemmt, nach kaudal gezogen, der Ösophagus dargestellt, dieser samt mitführender Gefäße zweifach unterbunden und anschließend durchtrennt. Es folgte die Freipräparierung der linken und mittleren Leberlappen von Magen und Milz. Das Darmkonvolut wurde nun zur Seite geschoben und nach Darstellung der V.cava inf. um diese oberhalb der Nierenvenen eine lockere Ligatur gelegt. Anschließend wurde das Duodenum etwas kaudal der Gallengangseinmündung angeklemmt und von der Leber weggezogen, sodaß die nun freiliegende Pfortader einschließlich der A.hepatica comm. und des Gallenganges proximal der V.pylorica unterfahren und mit einem Faden angeschlungen werden konnte. Eine zweite lockere Ligatur wurde einige Millimeter distal gelegt. Nach Fixation der Pfortader mittels einer Gefäßklemme wurde diese mit einem kleinen Schnitt eröffnet und ein mit Perfusionsmedium langsam durchströmter Kunststoffkatheter (Innendurchmesser 1,2 mm) bis zur Leberpforte eingeführt, der dann mittels der angelegten Ligaturen eingebunden werden konnte. Einige Sekunden später war die Leber bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min/g entblutet. Nun wurde die Ligatur um die V.cava inf. zugezogen und die Aorta abdominalis zur Volumenentlastung der Leber durchtrennt. Jetzt wurde die Perfusionsgeschwindigkeit auf 3 - 4 ml/min/g erhöht, um so eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Leber zu gewährleisten.

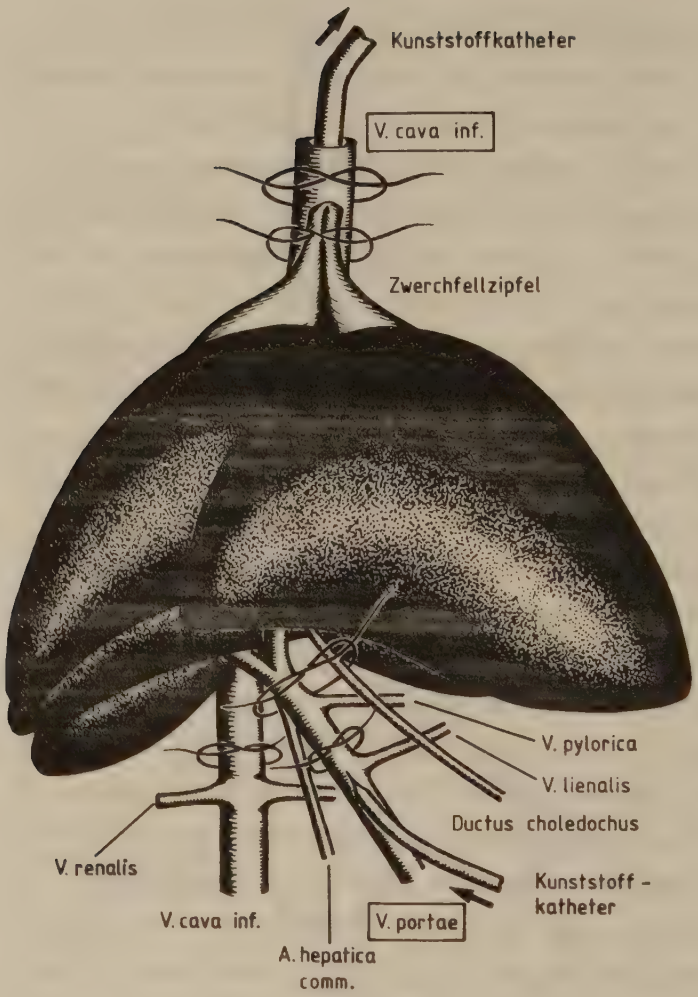


Abb. 4 Darstellung der Gefäße und der Lage der Ligaturen nach erfolgter Leberpräparation in situ (Abbindung der V.cava inf. kranial der Nierenvenen; Abbindung des Lig. hepatoduodenale proximal der V.pylorica; etwas distal davon eine zweite Abbindung der V.portae; doppelte Abbindung der V.cava inf. kranial der Leber)

Anschließend wurde der Thorax parasternal eröffnet, das Mediastinum freigelegt und durch das rechte Herzohr ein Katheter (Innendurchmesser 1,5 mm) in die V.cava inf. bis zur Leber vorgeschoben. Dieser wurde mittels zweier Ligaturen und unter Einbindung eines Zwerchfellzipfels fixiert. Nun konnte die Leber entlang der Wirbelsäule gänzlich aus ihrem Situs freipräpariert und in die Perfusionskammer eingebracht werden.

Die Dauer der Präparation bis zur Perfusion in situ betrug ca. 15 Minuten. Eine ischämische Schädigung der Leber konnte als ausgeschlossen angesehen werden, da eine kurzzeitige Anoxie nur zwischen der Pfortaderfixation und der Eröffnung der Aorta abdominalis mit anschließender Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit vorliegen konnte. Durch Oberflächen-Fluorometrie konnte SCHOLZ (1967) nachweisen, daß sich eine dreiminütige Anoxie der Rattenleber als vollständig reversibel erwies. In unserem Falle betrug diese Zeit nur etwa zwei Minuten.

Die Unterbindung des Gallenganges und der Leberarterie sind aus verschiedenerlei Gesichtspunkten gerechtfertigt und nötig: eine Freilassung beider Gefäße würde zu einem Perfusatverlust führen, der erhebliche Meßfehler in der arterio-venösen Metabolitenbestimmung zur Folge hätte. Eine durch die Ligatur entstehende Gallestauung ist von untergeordneter Bedeutung, da durch das fehlende Vorhandensein von Hämoglobin die Galleproduk-

tion mit zunehmender Perfusionsdauer sistiert (SCHOLZ, 1967). Nach einer Stunde beträgt sie nur noch 1o% der normalen Aktivität. Die Unterbindung der Leberarterie führt in keinster Weise zu einer Sauerstoffminderversorgung, da sie keine eigenen Gewebsbezirke versorgt, sondern lediglich das venöse Pfortaderblut arterialisiert (SCHOLZ, 1967).

3.6. Versuchsdurchführung

3.6.1. Normotherme Kurzzeitperfusion

Nach Fixierung der isolierten Rattenleber in der Organkammer wurde zunächst der vorgewählte flow gemessen (siehe Abb. 1) und bei eventuellen Abweichungen nachreguliert. Von nun an wurde die Perfusionsgeschwindigkeit an der Schlauchpumpe nicht mehr geändert; Abweichungen nach oben und unten konnten somit eindeutig einer Lebergefäßreaktion zugeschrieben werden.

In der Mehrzahl der durchgeführten Versuche wurde die Leber initial mit oxygenierter K-H-Lösung ohne Substrat- und Stimulationszusatz für eine Dauer von 1o - 8o Minuten (je nach Fragestellung) bei 37°C ausgewaschen. Anschließend wurde das Perfusionsmedium gegen eine K-H-Lösung mit NH_4Cl als Substrat, der je nach Zielsetzung des Versuches noch weitere Komponenten zugesetzt waren,

ausgetauscht. Um den Einfluß verschiedener Lösungszusätze auf das Reaktionsgeschehen in der Leber erarbeiten zu können, wurden in einigen Experimenten mehrere derartige Perfusatwechsel vorgenommen. Während des gesamten Versuchsablaufs wurden die Perfusat- und Kammertemperaturen auf 37°C - 38°C konstant gehalten, in bestimmten Zeitabständen venöse Perfusatproben entnommen und ebenso der flow registriert. Am Versuchsende wurden die Meßproben mit den unten aufgeführten Reagenzien versetzt und nach Ablauf der nötigen Inkubationszeit photometrisch ausgewertet.

3.6.2. Hypotherme Kurzzeitperfusion

Der Versuchsbeginn entspricht dem in Abschnitt 3.6.1. schon genannten Ablauf. Nach der Auswaschperfusion mit K-H-Lösung (Dauer ca. 2o min) wurde die Rattenleber bei 37°C mit einer K-H-Lösung, der 2,5 mM Lactat, o,5 mM Pyruvat, 1,o mM Ornithin und 2,o mM Ammoniak zugesetzt waren (siehe auch Abschnitt 5.1.1.2.), für eine Zeitdauer von 4o - 5o Minuten weiterperfundiert. Es folgte anschließend eine kontinuierliche Abkühlung des Perfusates und der Organkammer mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h bis zu einer Temperatur von 4°C, die 2o - 3o Minuten konstant gehalten, sodann mit der gleichen Geschwindigkeit wieder bis auf 37°C gesteigert und 6o - 8o Minuten beibehalten wurde.

Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufes.

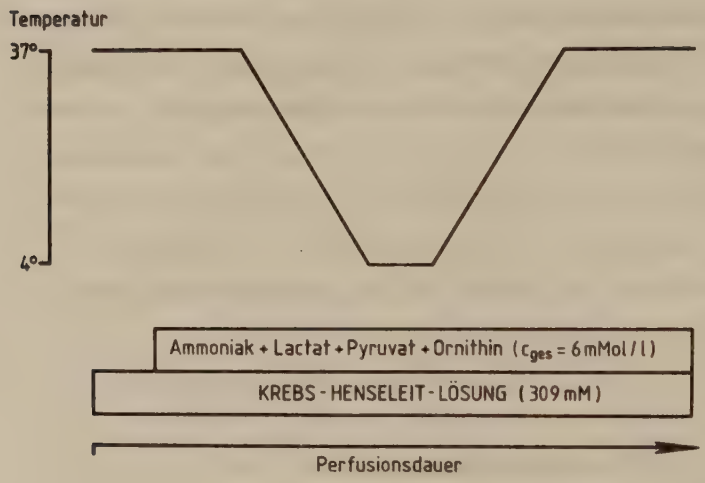


Abb. 5 Temperatur-Zeit-Diagramm der hypothermen Kurzzeitperfusion

Die Abbildung zeigt den Temperaturverlauf eines hypothermen Kurzzeitversuches: initiale Perfusion bei 37°C mit K-H-Lösung, der im weiteren Versuchsverlauf 2,5 mM Lactat, o,5 mM Pyruvat, 1,o mM Ornithin und 2,o mM Ammoniak zugesetzt wurden. Die Abkühlung auf 4°C und die Wiedererwärmung auf 37°C erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h. Nach der Erwärmung wurde die Leber bei 37°C 6o - 8o Minuten weiterperfundiert.

Während des gesamten Versuchsablaufs wurde eine Perfusionsgeschwindigkeit von 3 - 4 ml/min/g beibehalten.

Die venösen Meßproben wurden in den Plateauphasen 3 - 5-minütig, in den Abkühlungs- bzw. Erwärmungsphasen jeweils nach einer Temperaturänderung von 1°C bzw. 2°C entnommen.

Bei allen Kurzzeitversuchen - hypotherm und normotherm - wurden die Lebern nur initial abgespült, aber nicht schwimmend gelagert.

3.6.3. Hypotherme Langzeitperfusion

Im Unterschied zur hypothermen Kurzzeitperfusion wurde hier die Leber nach 6o - 7o-minütiger normothermer Durchströmung (siehe oben) schlagartig auf 4°C bzw. 11°C abgekühlt. Während des darauffolgenden 24-stündigen hypothermen Temperaturplateaus wurden der Leber in einer Versuchsreihe reine K-H-Lösung (3o9 mM), in einer anderen Reihe K-H-Lösung mit 9o mMol/l Mannitol als osmotisch wirksamen Zusatz (4oo mM) dargeboten. Im Anschluß an die Kältephase wurde die Leber mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h wieder bis auf 37°C erwärmt und 6o - 8o Minuten temperaturkonstant weiterperfundiert. Für diese Wiedererwärmung wurde als Perfusat ebenfalls die in 3.6.2. genannte Lösung verwendet (siehe auch Abbildung 6).

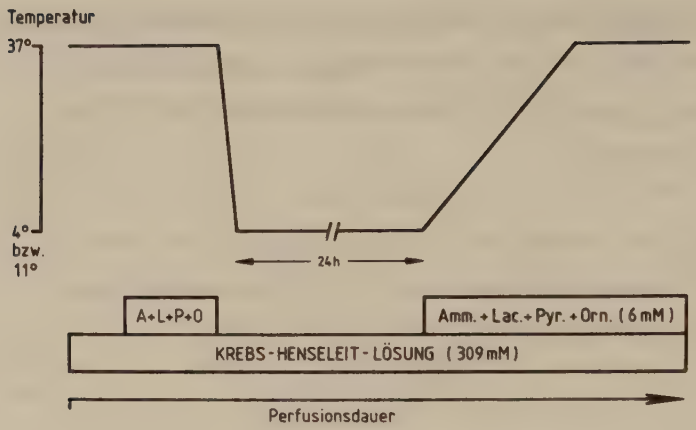


Abb. 6 Normoosmolare hypotherme Langzeitperfusion

Das Diagramm zeigt im Gegensatz zu Abbildung 5 nach der initialen Perfusion bei 37°C eine schlagartige Abkühlung auf 4°C bzw. 11°C. Während der 24-stündigen Kältephase wurde der Leber bei reduziertem Durchflußvolumen reine K-H-Lösung ohne Zusätze dargeboten. Für die Wiedererwärmungsphase und finale Perfusion bei 37°C wurde - wie auch bei der Initialperfusion - eine K-H-Lösung mit den in Abb. 5 schon gezeigten Zusätzen verwendet.

Unterhalb einer Temperatur von ca. 11°C wurde die Leber nur noch mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 - 2 ml/min/g durchströmt, um einer kältebedingten intravasalen Druckerhöhung aus dem Wege zu gehen. Eine daraus resultierende Sauerstoffminderversorgung kann als ausgeschlossen angesehen werden (siehe Einleitung).

Bei dieser Versuchsreihe wurden Meßproben nur während der 37°C-Plateaus und der Erwärmungsphase entnommen.

Im Gegensatz zu den anderen Experimenten wurde die Leber während der 24-stündigen Hypothermiephase zusätzlich in dem jeweiligen Perfusionsmedium schwimmend gelagert.

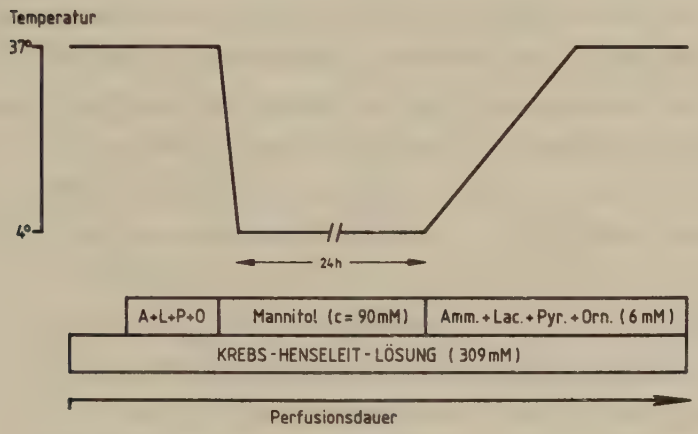


Abb. 7 Hyperosmolare hypotherme Langzeitperfusion

Das Diagramm zeigt einen, mit der normoosmolaren hypothermen Langzeitperfusion identischen Temperatur-Zeit-Verlauf (siehe Abb. 6), wobei hier jedoch während des 24-stündigen 4°C-Plateaus eine 4oo-millimolare K-H-Lösung (Zusatz von 9o mMol/l Mannitol) verwendet wurde.

4. AUSWERTUNG

4.1. Die photometrische Harnstoffmessung

4.1.1. Physikalisch-mathematische Grundlagen

Zur Ermittlung der Harnstoffkonzentration im venösen Perfusat benützten wir den von WARBURG (1938) eingeführten optischen Test, der darauf beruht, daß reduzierte Nicotinamid-adenin-dinucleotide Licht mit einem Maximum zwischen 338,5 und 34o,5 nm absorbieren, während die oxydierten Formen keine Absorption zwischen 3oo und 4oo nm zeigen (MATTENHEIMER, 1976). Wird nun eine Substanz mit NAD bzw. NADH zu einer Reaktion gebracht, bei der das entsprechende Dinucleotid oxydiert bzw. reduziert wird, so hat dies eine Konzentrationsänderung des Dinucleotids zur Folge, aus der unter der Annahme, daß die Reaktion vollständig abgelaufen ist, und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, mit Hilfe der Photometrie und des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes die Konzentration (-sänderung) der Substanz bestimmt werden kann:

$$dc = \frac{dE}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \qquad (1)$$

dE = Extinktionsänderung
ε = Extinktionskoeffizient
dc = Konzentrationsänderung
d = Schichtdicke (= 1 cm)
v = Volumen der Meßprobe
V = Gesamtvolumen in der Küvette (Meßprobe + Reagens)

Für NAD ergibt sich bei einer Wellenlänge von 366 nm ein Extinktionskoeffizient von 3,3 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Das Ergebnis erhält man in der Einheit "mM" .

Aus dieser Konzentrationsänderung läßt sich unter Miteinbeziehung der Perfusionsgeschwindigkeit und des Lebergewichtes die Produktionsgeschwindigkeit einer Substanz pro Gramm Lebergewebe wie folgt berechnen:

$$v/g = \frac{dE}{3{,}3 \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{flow \cdot 60}{m} = \frac{dc \cdot flow \cdot 60}{m} \quad (2)$$

mit: v/g = Produktionsgeschwindigkeit in µMol/h pro Gramm Lebergewebe

dc = Konzentrationsänderung in mM

flow = Perfusionsgeschwindigkeit in ml/min

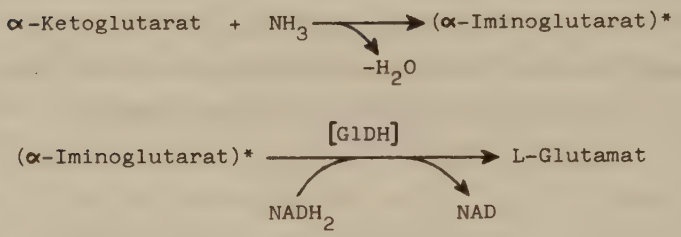
m = Lebergewicht in g

4.1.2. Biochemische Grundlagen

Mit Hilfe des Enzyms "Urease" können aus einem Molekül Harnstoff zwei Moleküle Ammoniak abgespalten werden:

(A) $$\begin{matrix} H_2N \\ H_2N \end{matrix}\!\!>\!C{=}O + H_2O \xrightarrow{[Urease]} 2\ NH_3 + CO_2$$

Der hierbei entstandene Ammoniak läßt sich nun in einer Dehydrogenase-Reaktion mit $NADH_2$ zur Reaktion bringen, wobei das Dinucleotid zu NAD oxydiert wird:



(B)

*) Zwischenprodukt

Aus den Reaktionen (A) und (B) wird ersichtlich, daß pro Mol gespaltenen Harnstoffes in der anschließenden Dehydrogenase-Reaktion genau zwei Mol $NADH_2$ oxydiert werden. Mit Hilfe des optischen Tests läßt sich somit unter Verwendung eines geeigneten Meßansatzes aus der Extinktionsabnahme, verursacht durch die Abnahme an $NADH_2$ im Meßansatz, exakt und absolut substratspezifisch die millimolare Konzentration von Harnstoff in der venösen Perfusatprobe bestimmen.

Die Bestandteile des Meßansatzes (SCHOLZ, 1979):

H_2O ..... 1oo ml
TRIS-Puffer ..... 68oo mg (56o mM) pH = 8,o
α-Ketoglutarat ..... 15o mg (1o,4mM)
ADP ..... 255 mg
EDTA ..... 21o mg
$NADH_2$ ..... 135 mg (1,9mM)
Glutamat-DH ..... 25oo µl

Das kristalline Enzym Urease wird in EDTA-Puffer mit pH = 6,5 gelöst:

EDTA-Puffer: 1 g EDTA/1oo ml H_2O
Urease: 5 mg/ml EDTA-Puffer

Bei einem Verdünnungsfaktor von 11oo/1oo (1ooo µl Meßreagens + 1oo µl Perfusatprobe) beträgt die maximal meßbare Ammoniakkonzentration ca. 18 mM und somit die maximal meßbare Harnstoffkonzentration 9 mM.

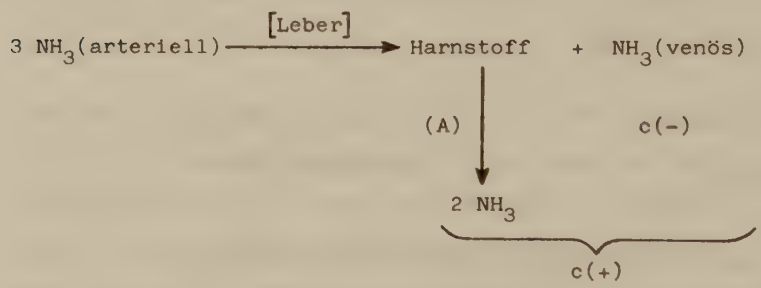
4.1.3. Praktische Durchführung der Messung

Um mit Hilfe der o.g. Meßmethode die Harnstoffkonzentration exakt ermitteln zu können, müssen sowohl der von der Rattenleber nicht verstoffwechselte Ammoniak, als auch der aus der Harnstoffspaltung im Meßansatz

resultierende Ammoniak bestimmt werden. Somit sind zwei photometrische Messungen durchzuführen:

- Bestimmung der venösen Konzentration des nicht verstoffwechselten Ammoniaks mit Hilfe der Reaktion (B)

- Bestimmung der venösen Konzentration des nicht verstoffwechselten Ammoniaks plus der Konzentration von NH_3 aus dem gespaltenen Harnstoff mit Hilfe der Reaktionen (A) und (B)



Aus c(-) und c(+) kann nun die Harnstoffkonzentration errechnet werden:

$$c_{Hst} = \frac{c(+) - c(-)}{2} \qquad (3)$$

Praktisches Vorgehen bei der Messung:

(a) Nullwertbestimmung der Extinktion ohne Urease
(Meßreagens + Perfusat ohne NH_3) E(0-)

(b) Nullwertbestimmung der Extinktion mit Urease (Meßreagens + 1o µl Urease + Perfusat ohne NH_3) E(O+)

(c) Extinktionsbestimmung der Meßproben ohne Urease (Meßreagens + venöses Perfusat) E(-)

(d) Nun werden in die Meßküvetten 1o µl Urease einpipettiert (Reaktionszeit: 2o - 3o Minuten)

(e) Extinktionsbestimmung der Meßproben mit Urease (Meßreagens + 1o µl Urease + venöses Perfusat) E(+)

Die endgültige Berechnung der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit ergibt sich aus den Formeln (1), (2) und (3):

$$v/g = \frac{dc(+) - dc(-)}{2} \cdot \frac{flow \cdot 6o}{m} =$$

$$= \frac{dE(+) \cdot 111o/1oo^{*} - dE(-) \cdot 11oo/1oo}{3,3 \cdot 2} \cdot \frac{flow \cdot 6o}{m}$$

$$v/g = \left\{\left[E(O+) - E(+)\right] \cdot 11,1^{*} - \left[E(O-) - E(-)\right] \cdot 11\right\} \cdot flow \cdot \frac{6o}{6,6m}$$

*) Durch Verwendung eines automatischen Photometers und durch Zugabe von 1o µl Urease erhöht sich hier der Verdünnungfaktor von 11,o auf 11,1 .

4.2. Die Temperaturabhängigkeit der Harnstoffproduktion

4.2.1. Die ARRHENIUS-Gleichung

ARRHENIUS stellte durch eine von ihm 1889 angegebene Gleichung die Parameter "Reaktionsgeschwindigkeitskonstante", "Aktivierungsenergie" und "absolute Temperatur" zueinander in Bezug (LATSCHA und KLEIN, 1977):

$$k = A \cdot e^{-E/RT} \qquad \text{oder:} \qquad \ln k = \ln A - \frac{E}{R \cdot T}$$

Hierbei sind:

k = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

E = Aktivierungsenergie

R = Allgemeine Gaskonstante (= 8,316 $J \cdot K^{-1} \cdot Mol^{-1}$)

T = Absolute Temperatur

A = Proportionalitätsfaktor

Zur besseren graphischen Darstellung wurde der natürliche Logarithmus in den dekadischen Logarithmus umgeformt:

$$\lg k = \frac{\ln A}{2{,}303} - \frac{E}{2{,}303 \cdot R \cdot T} \qquad \text{mit:} \quad \lg k = \frac{\ln k}{2{,}303}$$

$$\text{Da } \ln A = \text{konstant, folgt:} \quad \lg k = C - \frac{E}{2{,}303 \cdot R \cdot T}$$

Bei einer enzymatischen Reaktion ist die Reaktionsgeschwindigkeit in einem bestimmten Bereich abhängig von der Substratkonzentration (MICHAELIS-MENTEN). Wählt man diese Konzentration so hoch, daß das Enzym abgesättigt ist, und sorgt man durch permanente Substratzufuhr für eine Konstanthaltung dieser Konzentration, so läuft die Reaktion nach einer bestimmten Anlaufphase mit einer konstanten Maximalgeschwindigkeit ab und ist vergleichbar mit einer Reaktion nullter Ordnung, bei der gilt:

$$v = -\frac{dc}{dt} = k \qquad \text{mit: } c = \text{Substratkonzentration}$$

Daraus ergibt sich für die ARRHENIUS-Gleichung:

$$\lg v = \lg \frac{dc}{dt} = C - \frac{E}{2{,}303 \cdot R \cdot T}$$

Somit ist die Geschwindigkeit einer Reaktion nullter Ordnung nur von der Aktivierungsenergie (Enzym-substratspezifisch) und von der Reaktionstemperatur abhängig.

In Abbildung 8 ist dieser Zusammenhang anhand einer realistischen Modellreaktion graphisch dargestellt. Die angegebene Formel gibt die mathematische Gleichung der Exponentialfunktion der Reaktionsgeschwindigkeit an.

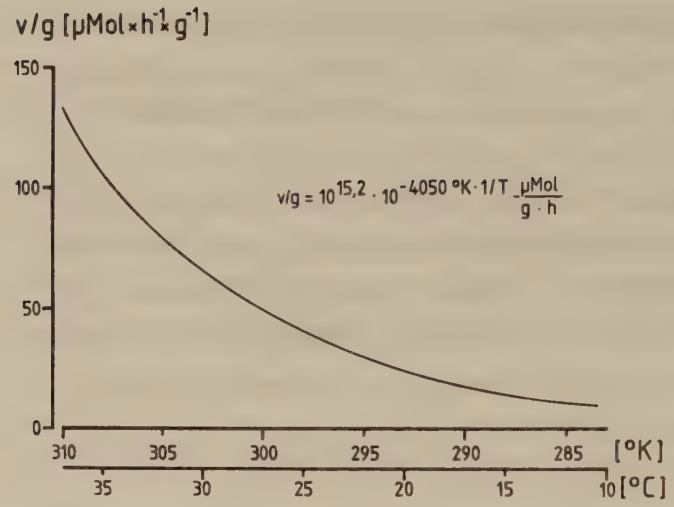


Abb. 8 Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion nullter Ordnung

Abszisse: Reaktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe (µMol/h/g)

Ordinate: Absolute Temperatur (°K) mit Vergleichsskala in °C

Die Kurve zeigt einen exponentiellen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmend sinkender Temperatur

4.2.2. Die graphische Darstellung

Bei konstanter Aktivierungsenergie ergibt die o.g. ARRHENIUS-Gleichung eine Gerade in folgender Form:

$$f(1/T): \quad \lg v = -\frac{E}{2{,}303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} + C$$

Ordinatenwert Steigung Abszissenwert Konstante

Zur besseren graphischen Übersicht wird der Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit (Ordinate) mit dem Reziprokwert der absoluten Temperatur (Abszisse) in Bezug zueinander gesetzt (Abb. 9), wobei durch Darstellung auf semilogarithmischem Papier (logarithmische Ordinateneinteilung) die Reaktionsgeschwindigkeit direkt eingetragen werden kann.

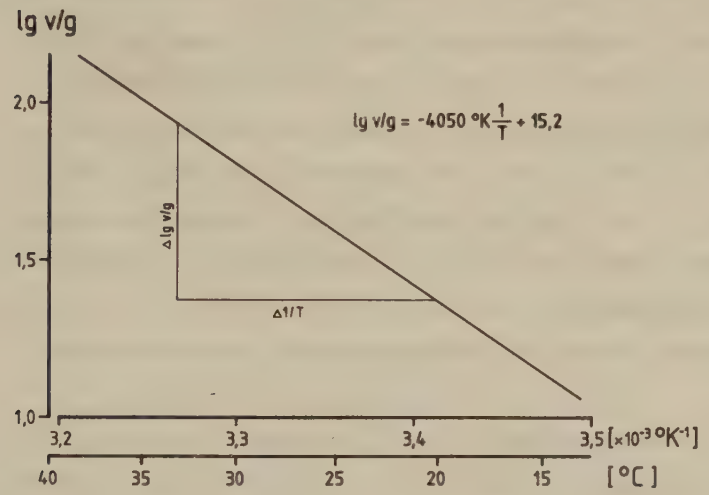


Abb. 9 Die semilogarithmische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Reziprokwert der absoluten Temperatur

Durch logarithmische Unterteilung der Ordinate (lg v = Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit) und Auftragung der reziproken absoluten Temperatur auf der Abszisse (1/°K) läßt sich der exponentielle Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit bezüglich der Temperatur in eine lineare Funktion überführen. Die gezeigte Gerade entspricht der in Abb. 8 dargestellten Funktion.

4.2.3. Die Berechnung der Regressionsgeraden

Bei den Stoffwechseluntersuchungen mit Abkühlung und Wiedererwärmung wurde zur Ermittlung des optimalen Geradenverlaufes das Prinzip der linearen Regression von x nach y angewandt. Diese Methode gewährleistet den bestmöglichsten Schluß von 1/T nach lg v/g, aber nicht umgekehrt. Da nun der Kurvenverlauf aus einer mehrfach geknickten Geraden bestand (siehe 5.1.2.), war der Berechnung zuerst die graphische Darstellung der Meßwerte im semilogarithmischen Koordinatensystem voranzustellen. Dazu wurden die einzelnen Geradenstücke optisch ermittelt, um die Lage der Knickstellen festsetzen zu können. Hiermit waren dann die für die Berechnung der Geraden ausschlaggebenden Definitionsbereiche festgelegt und die Geraden konnten nun einzeln für sich berechnet werden.

Alle Berechnungen wurden mit dem SHARP-Computer PC-1210 unter Verwendung der Programmiersprache BASIC und der unten angeführten Formeln durchgeführt:

Form der Regressionsgeraden von x nach y: $y = a + b \cdot x$

mit: a = Achsenabschnitt (= Konstante)

b = Steigung (= Regressionskoeffizient von x nach y)

$$a = \bar{y} - \frac{Sxy}{S^2x} \cdot \bar{x} \qquad b = \frac{Sxy}{S^2x}$$

mit: $\bar{y}$ = Mittelwert aller y-Werte

$\bar{x}$ = Mittelwert aller x-Werte

$$Sxy = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\right]$$

$$S^2x = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2$$

N = Gesamtzahl aller Wertepaare (im vorliegenden Fall gleich der Anzahl aller y-Werte)

In der Versuchsreihe 5.1.2. (hypotherme Harnstoffsynthese) wurden die Geraden aus mehreren gleichartigen Versuchen ermittelt. Da sich die einzelnen Versuche in ihrem Null-Wert-Niveau voneinander unterschieden, im Kurvenverlauf jedoch deckungsgleich waren, mußten die einzelnen Kurven zuerst durch eine individuelle Nullwert-Korrektur auf ein gleiches Niveau gebracht werden. Dies wurde durch eine vertikale Abszissenverschiebung in Richtung des Mittelwertes der einzelnen graphischen Darstellungen bewerkstelligt. Daraus ergaben sich für jede

Kurve entsprechende y-Korrekturfaktoren, die in die Berechnung der endgültigen Regressionsgeraden miteinbezogen wurden. Somit ist der sich daraus ergebende Kurvenverlauf bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit, nicht aber der Temperaturabhängigkeit, als ein relativer und nicht absoluter anzusehen. Die Lage im Diagramm entspricht der Mittelwertslage der einzelnen Versuche.

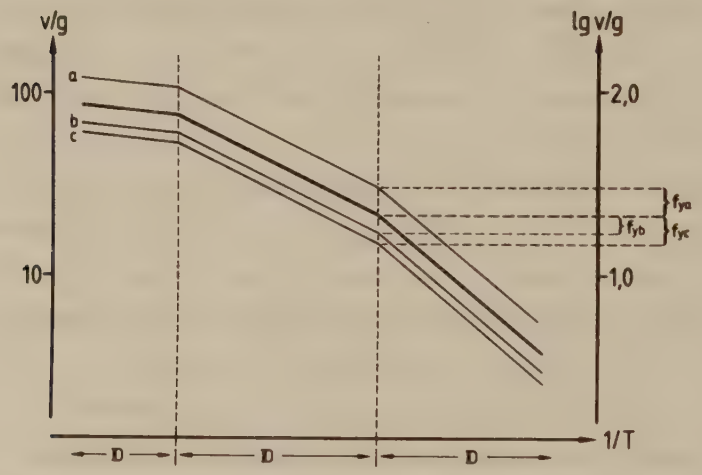


Abb. 1o Nivellierung der einzelnen Versuchskurven auf eine gemeinsame Mittelwertskurve durch vertikale Abszissenverschiebung

Durch die Verschiebung der einzelnen Graphen auf der Abszisse (Reaktionsgeschwindigkeit = = v/g) in Richtung Mittelwert ergeben sich für jede Kurve verschiedene y-Korrekturfaktoren (= f_{ya}, f_{yb} und f_{yc}). Ferner dargestellt sind die einzelnen Definitionsbereiche (= D).

4.2.4. Der Faktor "Q_{10}"

Der Q_{10} ist ein dimensionsloser Faktor, um den sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturverschiebung von 10°C ändert. Für anorganische Reaktionen beträgt er ca. 2 - 3 . Er läßt sich aus der in 4.2.2. angegebenen Geradengleichung und unter Berücksichtigung der Definitionsbereiche wie folgt berechnen:

$$Q_{10} = \frac{v(x)}{v(x - 10°C)}$$

Hierbei sind:

$v(x)$ = Reaktionsgeschwindigkeit bei x°C

$v(x - 10°C)$ = Reaktionsgeschwindigkeit bei x°C minus 10°C

Bei enzymatisch katalysierten Reaktionen kann man verschiedene Q_{10}-Werte erwarten, da die Proteinstruktur des Enzyms berücksichtigt werden muß (DIXON und WEBB, 1958).

4.2.5. Die Aktivierungsenergie

Die Aktivierungsenergie ist diejenige Energie, die benötigt wird, um eine Reaktion ablaufen zu lassen. Sie läßt sich aus der ersten Ableitung der in 4.2.2. angegebenen Geradengleichung und ebenfalls unter Berücksichtigung der Definitionsbereiche für die jeweiligen Geradenabschnitte berechnen (siehe dazu auch Abb. 9):

$$f(1/T)': \quad \frac{d \lg v}{d\ 1/T} = \frac{-E}{2{,}303 \cdot R}$$

$$E = -\frac{d \lg v}{d\ 1/T} \cdot 2{,}303 \cdot R$$

Die Werte "d lg v" und "d 1/T" können sowohl mit der Geradengleichung errechnet, als auch direkt der graphischen Darstellung entnommen werden.

Das Ergebnis erhält man in der Einheit "kJ/Mol" .

5. VERSUCHSERGEBNISSE

5.1. Stoffwechseluntersuchungen

Wie in Abschnitt 2.1. schon erwähnt, sollte die Harnstoffsynthese als Bewertungsmaßstab für die Funktionstüchtigkeit der konservierten Rattenleber zu Hilfe genommen werden. Um aber diesen Parameter richtig interpretieren zu können, mußten zuerst noch Untersuchungen hinsichtlich der Reaktionskinetik der Harnstoffbildung in der Leber vorgenommen werden. Es galt, die nötige Dauer der Auswaschperfusion und die Zeit, die zur Erreichung der maximalen Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit benötigt wird, zu bestimmen. Ferner mußten die optimale Substratkonzentration und die Stoffmengen der Stimulantien bzw. Energielieferanten ermittelt werden. Ebenso wurde im Hinblick auf die hypothermen Konservierungsversuche die Temperaturabhängigkeit der stimulierten Harnstoffsynthese in der Rattenleber aufgeklärt.

5.1.1. Die normotherme Harnstoffsynthese

Untersuchungen von DIETZ (1978) zeigten, daß die Harnstoffsynthese aus NH_4^+ unter Zugabe von Ornithin nur wenig aussagekräftige Meßwerte liefert. Somit war eine Beigabe von Stimulantien bzw. Substraten zum Perfusionsmedium unumgänglich.

Alle normothermen Experimente wurden bei einer Temperatur von 37°C - 38°C durchgeführt.

5.1.1.1. Stimulierung mit Lactat und Pyruvat

In dieser Versuchsreihe (NR.3, 4, 5 und 7) wurden die Lebern nach initialer Auswaschperfusion (außer Nr. 7) mit einer K-H-Lösung durchströmt, der als Substrat 1,oo mM NH_4Cl und als Stimulantien 2,oo mM Lactat und o,25 bzw. o,5o mM Pyruvat (Nr. 7) zugesetzt waren. Weiterhin wurden noch 1o,oo mMol/l Glukose zur eventuellen Membranstabilisierung beigegeben (TOLEDO-PEREYRA, 1979). Daraus ergab sich eine theoretische Osmolarität des Perfusionsmediums von ca. 322 mMol/l.

Die hiermit in den Versuchen Nr. 3 und Nr. 4 erreichten maximalen Produktionsgeschwindigkeiten lagen bei 6o bzw. 7o µMol/h/g.

Das Maximum der Produktionsgeschwindigkeit wurde bei diesen Versuchen ca. 7o Minuten nach der Auswaschperfusion erreicht.

Der zeitliche Verlauf der Harnstoffsyntheseleistung unter normothermen Bedingungen ist in Abbildung 11 dargestellt.

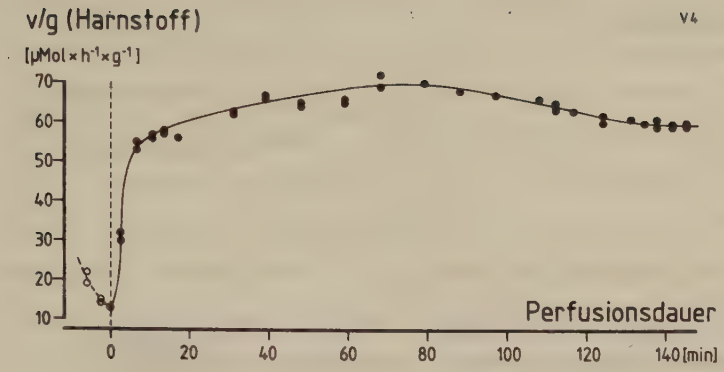


Abb. 11 Die Harnstoffproduktion in der Rattenleber bei 37°C - 38°C mit einer Auswaschphase von 12 Minuten

Ordinate: Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe

Abszisse: Perfusionsdauer

Die Abbildung zeigt einen raschen Anstieg der Harnstoffsynthesegeschwindigkeit nach der 12-minütigen Auswaschperfusion. Das Maximum mit 7o µMol/h/g wird ca. 7o Minuten nach Lösungswechsel erreicht.

Um die Abhängigkeit der Dauer, die zur Erreichung von v_{max} benötigt wird, von der Dauer der Auswaschphase zu ergründen, wurde in Versuch Nr. 5 die Leber 8o Minuten lang mit K-H-Lösung durchströmt und anschließend mit dem o.g. Perfusionsmedium weiterperfundiert. Es zeigte sich, daß der Restharnstoff nach ca. 15-minütiger Auswaschung aus der Leber entfernt war, daß aber die maximale Produktionsgeschwindigkeit bereits 2o Minuten nach dem

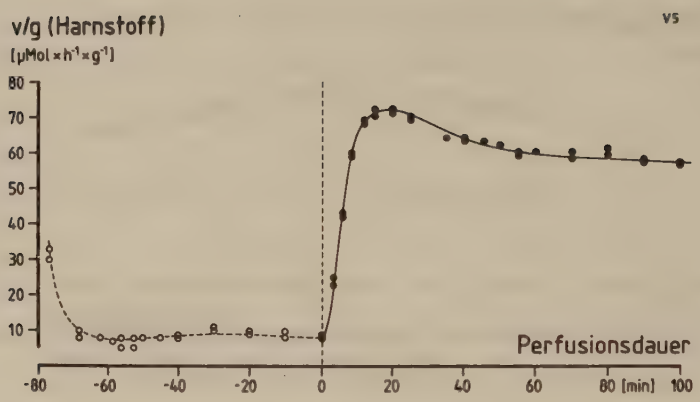


Abb. 12 Die Harnstoffproduktion in der Rattenleber bei 37°C - 38°C mit einer Auswaschphase von 8o Minuten

Ordinate: Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe

Abszisse: Perfusionsdauer

Durch die langdauernde Auswaschperfusion kann eine steil ansteigende Harnstoffproduktion nach Lösungswechsel beobachtet werden. Das Maximum mit 7o µMol/h/g wird hier bereits nach 2o Minuten erreicht.

Lösungswechsel erreicht wurde, also in einem wesentlich kürzeren Zeitraum wie in den schon genannten Versuchen.

Der Grund mag wohl darin liegen, daß der Harnstoffzyklus in der Leber durch den länger dauernden Substratentzug (hier: 8o min) wesentlich empfindlicher reagiert. Die in Abb. 12 gezeigte Kurve läßt auch vermuten, daß der Harnstoffzyklus in der Leber auf einen plötzlichen Anstieg der Ammoniakkonzentration mit einer kurzzeitigen

Hyperaktivität antwortet, die sich aber nach geraumer Zeit auf einen konstanten Wert einpegelt.

Dieses Phänomen wurde in einem 5-stündigen Versuch weiter untersucht, wobei die Leber nicht initial ausgespült, sondern sofort mit dem o.g. Substratgemisch perfundiert wurde. Dabei zeigte sich, daß v_{max} erst nach einer Perfusionszeit von 7o Minuten erreicht wurde (da keine Auswaschperfusion erfolgte) und daß sich die Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit nach ca. 3-stündiger Perfusionsdauer auf einen konstanten Wert einpegelte (ca. 52 µMol/h/g).

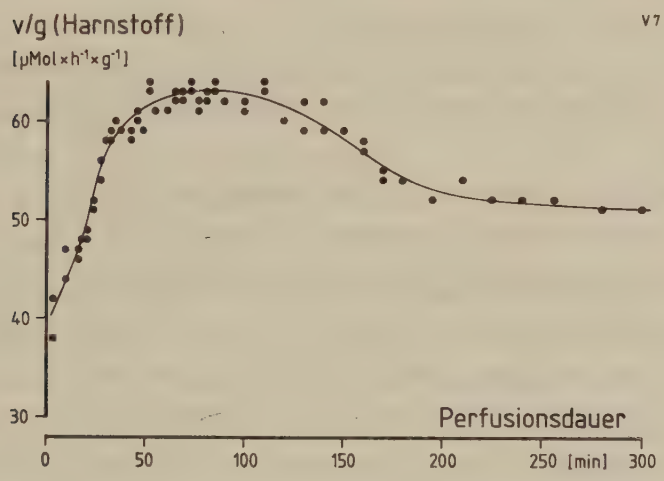


Abb. 13 Die Harnstoffproduktion in der Rattenleber bei 37°C - 38°C ohne Auswaschperfusion

Die Abbildung läßt einen trägen Anstieg der Harnstoffsynthesegeschwindigkeit nach Perfusionsbeginn erkennen, die nach ca. 7o Minuten ihr Maximum erreicht und dann zu einem Plateau hin abfällt (Versuchsdauer: 5 Stunden)

Im Hinblick auf die Konservierungsexperimente sollte die initiale normotherme Perfusion der Leber möglichst kurz gehalten werden, um einer eventuellen Schädigung vorzubeugen. Als idealer Kompromiß erwies sich dafür eine Auswaschperfusion von 2o-minütiger Dauer mit nachfolgender Substratperfusion. Um aber eine optimale und aussagekräftige Produktionsgeschwindigkeit zu erreichen, wurde eine weitere Stimulation der Harnstoffsynthese versucht. Dadurch sollten sowohl der Energiebedarf in der Leber als auch die Aussagekraft der Meßwerte gesteigert werden.

5.1.1.2. Stimulierung mit Lactat, Pyruvat und Ornithin

In den unten dargestellten Experimenten wurde versucht, durch zusätzliche Beimischung von Ornithin die Produktionskapazität des Harnstoffzyklusses in der Leber weiter zu erhöhen. Auf die Zugabe von Glukose wurde in den weiteren Versuchen verzichtet, um die Osmolarität des Perfusionsmediums nicht unphysiologisch zu steigern.

Zur Veranschaulichung des Effektes der einzelnen "Additives" auf die Harnstoffsynthese wurden die Substanzen der Leber in verschiedener Kombination und Reihenfolge angeboten. Folgende Stoffmengen wurden in das Perfusionsmedium eingewogen:

2,o mMol/l NH_4Cl

2,5 mMol/l Lactat

o,5 mMol/l Pyruvat

1,o mMol/l Ornithin

In den Versuchen Nr. 1o, Nr. 11 und Nr. 12 wurden den Lebern nach einer 15 - 2o-minütigen Auswaschperfusion mit K-H-Lösung Ornithin und NH_4Cl in o.g. Konzentration im arteriellen Perfusat angeboten. Nach ca. 2o-minütiger Perfusionsdauer wurden zusätzlich noch Lactat und Pyruvat dem Perfusat beigegeben, um die Harnstoffproduktion weiter zu optimieren. 2o - 4o Minuten später wurden den Lebern diese beiden Substanzen wieder entzogen; nach weiteren 1o - 2o Minuten wurden die Lebern nur noch mit reiner K-H-Lösung leergewaschen.

Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Beide Versuche zeigen nach der Auswaschperfusion einen raschen Anstieg der Harnstoffsynthesegeschwindigkeit, die nach ca. 1o Minuten ihr Maximum erreicht und anschließend wieder etwas abfällt. Nach zusätzlicher Beigabe von Lactat und Pyruvat zum Perfusionsmedium läßt sich die Produktionsgeschwindigkeit um ein Weiteres steigern (Abschnitt C in den Abbildungen 14 und 15). Versuch Nr. 1o zeigt hierbei eine ausgeprägte Plateauphase, ganz im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen (siehe 5.1.1.1.). Nach Entzug der beiden "Additives" Lactat und Pyruvat fällt die Syntheseleistung der Leber

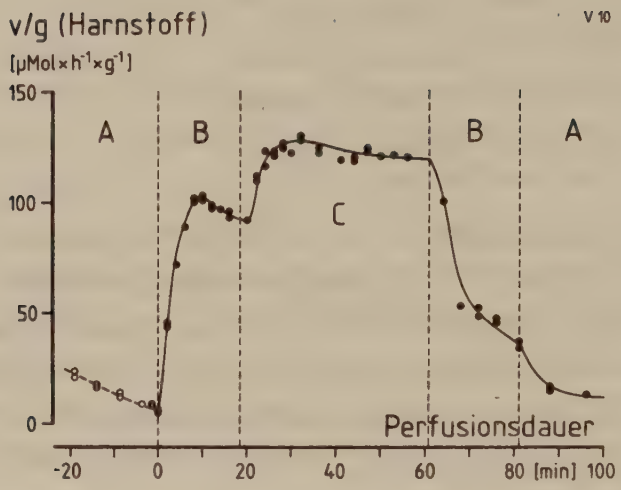


Abb. 14 Die stufenweise stimulierte Harnstoffproduktion in der Rattenleber bei 37°C - 38°C

Ordinate: Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe

Abszisse: Perfusionsdauer

(A) : Auswaschperfusion mit K-H-Lösung

(B) : Zugabe von NH_4Cl und Ornithin

(C) : weitere Zugabe von Lactat und Pyruvat

Nach Zugabe von NH_4Cl und Ornithin zum Perfusat zeigt der Kurvenverlauf einen raschen Anstieg der Harnstoffsyntheseleistung bis zu einem Maximum von 1oo µMol/h/g. Durch weitere Zugabe von Lactat und Pyruvat (C) läßt sich die Maximalproduktion noch um 25% steigern.

bei Perfusion mit NH_4Cl und Ornithin innerhalb von 1o Minuten mehr oder minder deutlich ab.

Die unterschiedlichen Versuchsergebnisse der beiden dargestellten Experimente (Abb. 14 und Abb. 15)

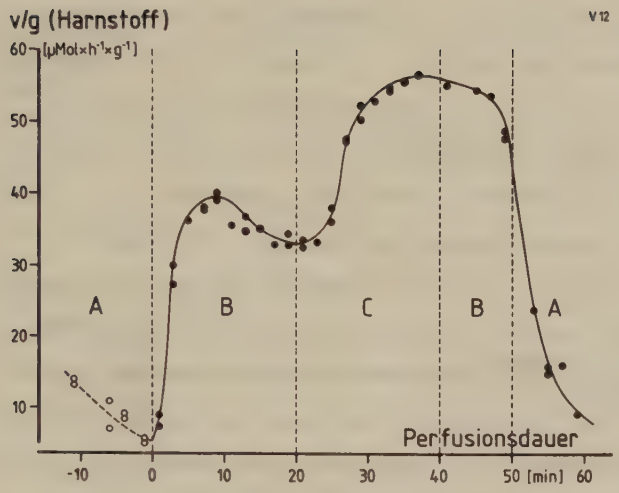


Abb. 15 Die stufenweise stimulierte Harnstoffproduktion in der Rattenleber bei 37°C - 38°C

Ordinate: Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe

Abszisse: Perfusionsdauer

(A) : Auswaschperfusion mit K-H-Lösung

(B) : Zugabe von NH_4CL und Ornithin

(C) : weitere Zugabe von Lactat und Pyruvat

Die Abbildung läßt einen raschen Anstieg der Harnstoffproduktion nach Zugabe von NH_4Cl und Ornithin (B) bis zu einem Maximum von 4o µMol/h/g erkennen, das sich nach weiterer Zugabe von Lactat und Pyruvat auf 57 µMol/h/g erhöhen läßt (C). Die im Vergleich mit Abb. 14 hier wesentlich niedriger liegenden Maxima lassen sich durch eine unzureichende Perfusionsgeschwindigkeit erklären.

bezüglich der Absolutwerte der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit und des Reaktionsgeschehens in Phase B(2)

lassen sich durch die unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten erklären: in Versuch Nr. 1o (Abb. 14) wurde die Rattenleber mit einem mittleren flow von 3,7 ml/min/g, in Versuch Nr. 12 (Abb. 15) mit 2,3 ml/min/g durchströmt (siehe dazu Abschnitt 3.1.). Die dadurch bedingte hypoxische Perfusion in Versuch Nr. 12 führte zu einer deutlichen Senkung der Maximalgeschwindigkeiten; auch der Geschwindigkeitsverlauf in Phase B(2) zeigt eine deutliche Abweichung gegenüber Versuch Nr. 1o, die dadurch erklärbar ist, daß durch die Sauerstoffminderversorgung keine maximale Stimulation erfolgen konnte und somit der zu erwartende Geschwindigkeitsabfall nach Entzug von Lactat und Pyruvat nicht klar genug ersichtlich wurde.

Zur weiteren Aufdeckung des Einflusses der einzelnen Stimulationsbeigaben auf die Harnstoffproduktion wurden Untersuchungen durchgeführt, wobei Lactat, Pyruvat, Ornithin und NH_4Cl in verschiedenen Kombinationen wechselweise der Leber im Perfusionsmedium angeboten wurden. In den Versuchen Nr. 8, Nr. 9, Nr. 13 und Nr. 14 wurde nach initialer Auswaschung mit Lactat, Pyruvat und NH_4Cl weiterperfundiert und zwischendurch zusätzlich Ornithin der Leber angeboten (Abbildung 16). In den Versuchen Nr. 15 und Nr. 16 wurde das Verfahren umgedreht, indem Lactat, Pyruvat, Ornithin und NH_4Cl dem Perfusat mit einem zwischenzeitlichen Ornithinentzug beigegeben wurden.

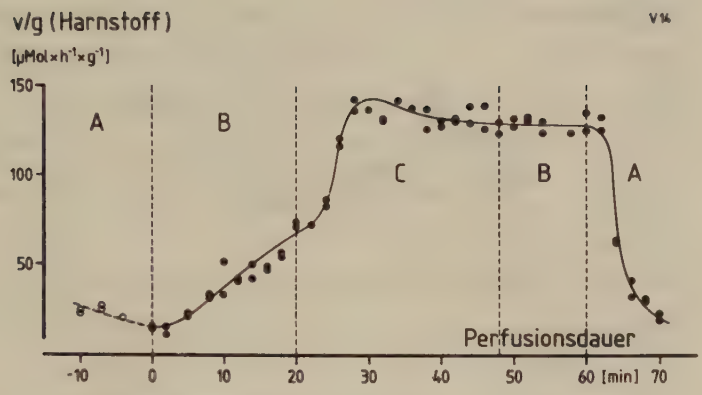


Abb. 16 Die wechselseitig stimulierte Harnstoffsynthese in der Rattenleber bei 37°C - 38°C

(A) : Auswaschperfusion mit K-H-Lösung
(B) : Zugabe von NH_4Cl, Lactat und Pyruvat
(C) : weitere Zugabe von Ornithin

Die Zugabe von NH_4Cl, Lactat und Pyruvat (B) kann nur eine allmähliche Steigerung der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit bewirken, die die in der gezeigten Perfusionsdauer von 2o Minuten zu keinem eindeutigen Maximum führt. Nach weiterer Beigabe von Ornithin (C) steigt die Geschwindigkeit rasch an und erreicht bei 15o µMol/h/g ihr Maximum, das in eine Plateauphase übergeht.

Aus den beiden Versuchsreihen (Abb. 16 und Abb. 17) wird deutlich, daß die Stimulation mit Lactat und Pyruvat eine relativ langsame Steigerung der Harnstoffsynthese zur Folge hat (Abb. 16, Phase B), während die Beigabe von Lactat, Pyruvat und zusätzlich Ornithin eine wesentlich schnellere und höhere Steigerung bewirkt (Abb. 17,

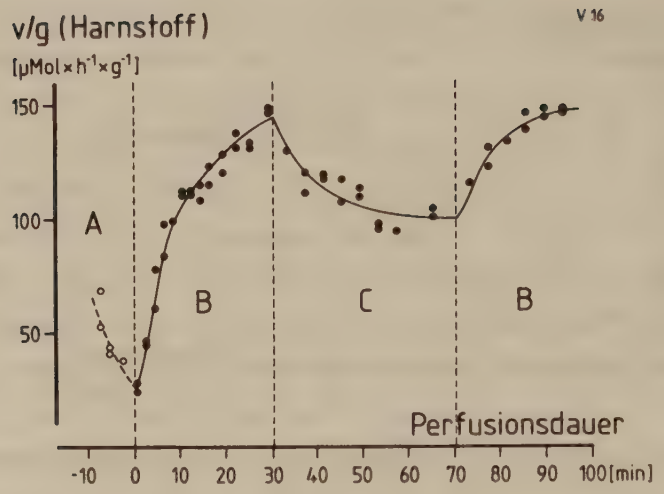


Abb. 17 Die wechselseitig stimulierte Harnstoffsynthese in der Rattenleber bei 37°C - 38°C

(A) : Auswaschperfusion mit K-H-Lösung

(B) : Zugabe von NH_4Cl, Lactat, Pyruvat und Ornithin

(C) : Ornithinentzug

Nach Stimulation mit Lactat, Pyruvat und Ornithin steigt die Harnstoffsynthesegeschwindigkeit rasch bis zu einem nicht eindeutig dargestellten Maximum von 145 µMol/h/g an (B) und fällt nach Ornithinentzug auf einen Wert von 1oo µMol/h/g zurück. Eine erneute Ornithinzugabe führt zu einem erneuten Anstieg auf ein Maximum von 145 µMol/h/g.

Phase B), was auch in Phase C des Versuches Nr. 14 ersichtlich wird. Der Entzug von Ornithin zieht einen raschen Abfall der Produktionsgeschwindigkeit nach sich (Abb. 17, Phase C), die aber durch erneute Beigabe

wieder auf den ursprünglichen Höchstwert zurückgeführt werden kann (Abb. 17, Phase B2).

Die hiermit maximal erreichbare Harnstoffsynthesegeschwindigkeit lag bei normoxischer Perfusion zwischen 14o und 15o µMol/h pro Gramm Lebergewebe.

Abschließend zu diesen Experimenten läßt sich Folgendes zusammenfassen:

- Je länger die Auswaschphase dauert, desto schneller wird nach Lösungswechsel die Maximalgeschwindigkeit erreicht.

- Durch die Stimulation mit Lactat und Pyruvat wird nur eine relativ langsame Steigerung der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in der Leber hervorgerufen, deren Maximum bei 6o - 7o µMol/h pro Gramm Lebergewebe liegt.

- Die zusätzliche Beigabe von Ornithin zu den schon genannten "Additives" bewirkt eine rasche Steigerung der Synthesegeschwindigkeit bis zu 15o µMol/h pro Gramm Lebergewebe.

- Eine Perfusionsgeschwindigkeit unter 3 ml/min pro Gramm Lebergewebe führt zu einer hypoxisch bedingten Mangelleistung des Rattenleberstoffwechsels.

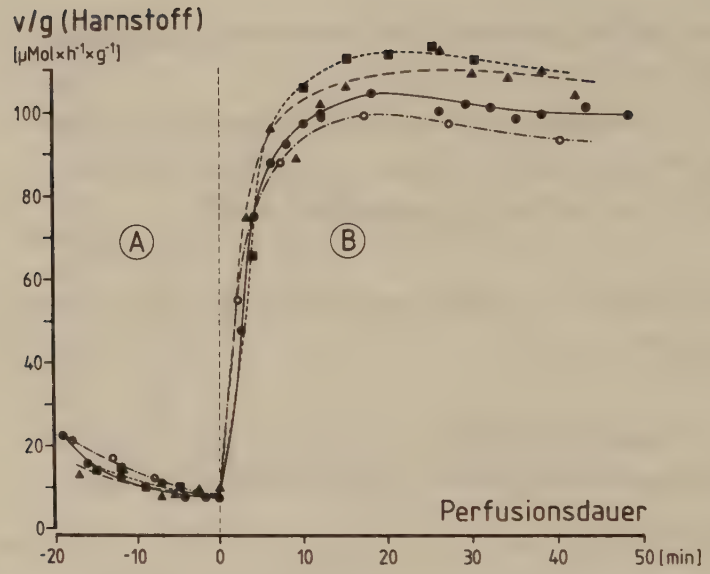


Abb. 18 Die vollstimulierte Harnstoffsynthese in der Rattenleber bei 37°C - 38°C mit einer Auswaschphase von 2o Minuten (A)

Ordinate: Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit
Abszisse: Perfusionsdauer

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Harnstoffsynthesegeschwindigkeiten von vier einzelnen Lebern; nach einer 2o-minütigen Auswaschphase wurden dem Perfusat NH_4Cl, Lactat, Pyruvat und Ornithin in schon genannter Konzentration zugegeben, was zu einem Anstieg der Geschwindigkeiten bis zu 12o µMol/h/g innerhalb einer Zeit von 25 Minuten führte (B).

Aufbauend auf die gewonnenen Erkenntnisse wurde in der folgenden Versuchsreihe untersucht, wann nach 2o-minütiger Auswaschung unter anschließender Perfusion mit dem

Zusatz von NH_4Cl, Lactat, Pyruvat und Ornithin in o.g. Konzentrationen das Maximum der Harnstoffsynthesegeschwindigkeit in der Rattenleber erreicht wird.

In Abbildung 18 sind vier derartige Experimente dargestellt, wobei zur besseren Veranschaulichung die einzelnen Kurven auf einen einheitlichen Ausgangs-Mittelwert (0 min, 8 µMol/h/g) verschoben wurden. Die jeweiligen Kurvenverläufe entsprechen jedoch exakt den einzelnen Versuchen.

Aus der Darstellung wird ersichtlich, daß bei einer 2o-minütigen Auswaschung die maximale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit spätestens 3o Minuten nach Lösungswechsel erreicht wird. Somit ist bei den Konservierungsversuchen eine normotherme Perfusion von mindestens 5o-minütiger Dauer für eine sichere Festlegung der Ausgangsstoffwechselaktivität durchzuführen (siehe auch 5.2.).

In Tabelle 1 sind noch einmal alle normothermen Stoffwechseluntersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 1 Stoffwechseluntersuchungen (normotherm)

Versuch	Dauer	Lösung + Zusätze	v_{max}	K-H	Leber	flow
3	12o	K-H	--	23	8,6	4,o
		+ 2,oo mM Lactat	6o			
		+ o,25 mM Pyruvat				
		+ 1o,oo mM Glukose				
		+ 1,oo mM Ammoniak				
4	157	K-H	--	12	9,o	3,5
		+ (siehe Versuch 3)	7o			
5	18o	K-H	--	8o	9,9	3,o
		+ (siehe Versuch 3)	72			
7	3oo	K-H	--	--	11,2	3,o
		+ 2,oo mM Lactat	63			
		+ o,5o mM Pyruvat				
		+1o,oo mM Glukose				
		+ 1,oo mM Ammoniak				
8	13o	K-H	--	1o	8,2	3,9
		+ 2,o mM Ammoniak	5o			
		+ 2,5 mM Lactat	75			
		+ o,5 mM Pyruvat				
		+ 2,o mM Ammoniak				
		+ 2,5 mM Lactat	11o			
		+ o,5 mM Pyruvat				
		+ 1,o mM Ornithin				
		+ 2,o mM Ammoniak				
9	24o	K-H	--	--	9,9	3,1
		+ 2,5 mM Lactat	65			
		+ o,5 mM Pyruvat				
		+ 2,o mM Ammoniak				
		+ 2,5 mM Lactat	1oo			
		+ o,5 mM Pyruvat				
		+ 1,o mM Ornithin				
		+ 2,o mM Ammoniak				
1o	12o	K-H	--	22	8,2	3,7
		+ 1,o mM Ornithin	1oo			
		+ 2,o mM Ammoniak				
		+ (siehe Versuch 9 letzter Teil)	128			

Tabelle 1 Stoffwechseluntersuchungen (normotherm)
(Fortsetzung 1)

Versuch	Dauer	Lösung + Zusätze	v_{max}	K-H	Leber	flow
11	71	K-H	--	18	13,8	2,3
		+ (siehe Versuch 1o)	43			
		+ (siehe Versuch 1o)	61			
12	75	K-H	--	16	13,3	2,4
		+ (siehe Versuch 1o)	4o			
		+ (siehe Versuch 1o)	55			
13	73	K-H	--	17	8,2	4,o
		+ 2,5 mM Lactat + o,5 mM Pyruvat + 2,o mM Ammoniak	8o			
		+ 2,5 mM Lactat + o,5 mM Pyruvat + 1,o mM Ornithin + 2,o mM Ammoniak	17o			
14	85	K-H	--	15	9,2	3,8
		+ (siehe Versuch 13)	7o			
		+ (siehe Versuch 13)	14o			
15	1o7	K-H	--	11	7,2	4,9
		+ 2,5 mM Lactat + o,5 mM Pyruvat + 1,o mM Ornithin + 2,o mM Ammoniak	145			
		+ 2,5 mM Lactat + o,5 mM Pyruvat + 2,o mM Ammoniak	12o			
		+ 2,5 mM Lactat + o,5 mM Pyruvat + 1,o mM Ornithin + 2,o mM Ammoniak	145			
16	1o7	K-H	--	1o	8,4	4,3
		+ (siehe Versuch 15)	148			
		+ (siehe Versuch 15)	11o			
		+ (siehe Versuch 15)	145			

Tabelle 1 Stoffwechseluntersuchungen (normotherm)
(Fortsetzung 2)

Versuch	Dauer	Lösung + Zusätze	v_{max}	K-H	Leber	flow
17	133	K-H	--	26	9,4	3,2
		+ 2,5 mM Lactat	9o			
		+ o,5 mM Pyruvat				
		+ 1,o mM Ornithin				
		+ 2,o mM Ammoniak				
2o	1o5	K-H	--	2o	8,6	3,5
		+ (siehe Versuch 17)	97			
21	9o	K-H	--	2o	9,o	3,4
		+ (siehe Versuch 17)	97			
23	7o	K-H	--	22	9,4	3,2
		+ (siehe Versuch 17)	122			

Zeichenerklärung:

v_{max} : maximale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in µMol/h pro Gramm Lebergewebe

K-H : Dauer der Auswaschperfusion in Minuten

flow : Perfusionsgeschwindigkeit in ml/min pro Gramm Lebergewebe

Dauer : Gesamtversuchsdauer in Minuten

Leber : Lebergewicht in Gramm

5.1.2. Die hypotherme Harnstoffsynthese

Hypothermie ist das Losungswort in der gesamten Organkonservierung, da nur mit Hilfe dieser Technik die Stoffwechselaktivität und damit der Sauerstoffverbrauch eines zu konservierenden Organs effektiv gesenkt werden kann (siehe auch Einleitung). Untersuchungen von DIETZ (1978) konnten aufzeigen, daß alle Stoffwechselvorgänge in der Rattenleber mit sinkender Temperatur ab- und bei anschließender Wiedererwärmung zunahmen. Ebenso wurde verdeutlicht, daß die Änderungen der einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten - hervorgerufen durch definierte Temperaturverschiebungen - untereinander stark variierten, und daß die Geschwindigkeitsänderungen mit den Temperaturverschiebungen innerhalb des gesamten Temperaturbereiches von 37°C bis 4°C nicht immer linear oder logarithmisch korrelierten, sondern in ihrem Verlauf einige, für jeden Stoffwechselvorgang spezifische, "Knickstellen" aufwiesen. Da in den Untersuchungen von DIETZ die Harnstoffsynthese nicht ausreichend stimuliert wurde, ergaben sich bezüglich einer Temperaturabhängigkeit nur schlecht verwertbare Ergebnisse. Somit erschien es notwendig, das Verhalten der stimulierten Harnstoffsynthese in der Rattenleber bezüglich definierter Temperaturänderungen zu untersuchen.

Die Versuchsdurchführung hierzu wurde bereits in Abschnitt 3.6.2. ausführlich beschrieben. Der zeitliche Verlauf der Produktionsgeschwindigkeit ist in Abb. 19

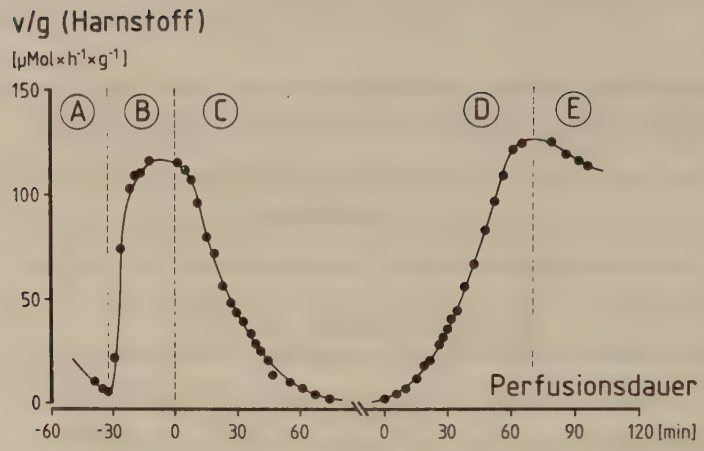


Abb. 19 Der zeitliche Verlauf der Harnstoffsynthesegeschwindigkeit bei Abkühlung (C) und Wiedererwärmung (D) (Versuch Nr. 24)

Ordinate : Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in µMol/h pro Gramm Lebergewebe

Abszisse : Perfusionsdauer in Minuten

Nach einer 2o-minütigen Auswaschperfusion (bei 37°C)(A) zeigt die Kurve nach Zusatz von Lactat, Pyruvat, Ornithin und NH_4Cl einen raschen Anstieg der Produktionsgeschwindigkeit auf ein Maximum von 11o µMol/h/g (B). Anschließend wurde die Leber mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h auf 4°C abgekühlt (C) und mit der gleichen Geschwindigkeit wieder auf 37°C erwärmt (D).
Der Kurvenverlauf in (D) und (E) zeigt eine eindeutige Reversibilität der Harnstoffbildung nach einer knapp 3-stündigen Hypothermie.

dargelegt, wobei in den Abschnitten (A), (B) und (E) bei einer Temperatur von 37°C - 38°C perfundiert wurde.

In den Phasen (C) bzw. (D) erfolgte eine Abkühlung bzw. Erwärmung mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h.

In dem dargestellten Versuch Nr. 24 wurde während der gesamten Versuchsdauer - wie bei allen folgenden Versuchen - die Laufgeschwindigkeit der Schlauchpumpe nicht geändert. Die initial gemessene Perfusionsgeschwindigkeit lag bei 3,9 ml/min/g, die maximale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit bei 11o µMol/h/g. Nach Abkühlung auf 4°C und anschließender Wiedererwärmung auf 37°C hatte sich der flow auf 3,6 ml/min/g verringert, was sich einer geringfügigen interstitiellen Ödembildung zuschreiben ließ. Interessanterweise erhöhte sich aber dabei die maximale Harnstoffsynthesegeschwindigkeit auf 115 µMol/h/g, also auf 1o5% des Ausgangswertes. Dieses Phänomen wurde in derartigen Experimenten mehrmals beobachtet (siehe auch Tabelle 2), wobei sich eine Begründung hierfür nur schwer finden ließ. Auch DOBBS und LEE (1979) konnten in ihren Untersuchungen ein ähnliches Verhalten beobachten. Eine mögliche Ursache könnte in der relativ langdauernden Senkung der Stoffwechselaktivität während der hypothermen Perfusion (Phase C und D) liegen, die die Rattenleber bei anschließender Normothermie mit einer Hyperaktivität beantwortete. Ein weiteres Indiz für diese Theorie ergibt sich aus der Tatsache, daß in Phase E die Produktionsgeschwindigkeit nach Erreichen des Maximalwertes wieder abfiel und die Tendenz zu einer Plateaubildung erkennen ließ, wie es schon bei der normothermen Harnstoffsynthese (5.1.1.1.) beobachtet wurde.

Der in Abbildung 19 gezeigte Versuch dient lediglich der Darstellung des zeitlichen Geschwindigkeitsverlaufes. Um eine Aussage über die Temperaturabhängigkeit der Harnstoffsynthese leisten zu können, mußten die Meßwerte der einzelnen Experimente in semilogarithmischem Maßstab gezeichnet werden, wobei auf der Abszisse die reziproke absolute Temperatur und auf der Ordinate der Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe eingetragen wurde (siehe auch 4.2.2.). Durch diese Darstellungstechnik konnten die exponentiell verlaufenden Versuchsergebnisse in ein lineares System überführt werden.

Abbildung 2o zeigt den Verlauf von vier gleichartigen Experimenten während einer Abkühlung der Lebern von 37°C auf 4°C mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h. Die Berechnung der Geraden hierzu wurde bereits in Abschnitt 4.2.3. beschrieben.

Es wird deutlich, daß der Kurvenverlauf aus einer zweifach abgeknickten Geraden besteht. Der erste "Knick" liegt bei einer Temperatur von ca. 28°C, der zweite bei ca. 17°C. Die von ARRHENIUS aufgestellte Gleichung (siehe 4.2.1.) läßt sich somit in diesem Falle nicht über den gesamten untersuchten Temperaturbereich anwenden; sie ist auf die Definitionsbereiche innerhalb der jeweiligen "Knickstellen" begrenzt. Somit läßt sich im Bereich von 37°C - 28°C eine Aktivierungsenergie von 11 kJ/Mol (Q_{10}= 1,1), im Bereich von 28°C - 17°C eine Aktivierungsenergie von 81 kJ/Mol (Q_{10}= 3,o) und im

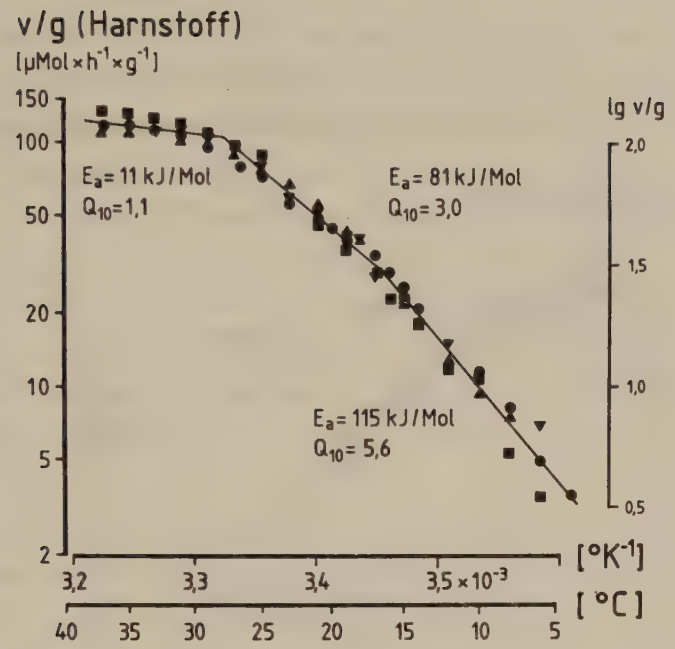


Abb. 2o Die Harnstoffsynthesegeschwindigkeit in der Rattenleber bei Abkühlung von 37°C auf 4°C

Ordinate : Logarithmus der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in µMol/h pro Gramm Lebergewebe

Abszisse : Reziproke absolute Temperatur in $°K^{-1}$ mit Vergleichsskala in °C

Die Abbildung zeigt eine deutliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Reaktionstemperatur. Diese Abnahme erfolgt jedoch nicht linear über den gesamten Temperaturbereich hinweg, sondern weist Unstetigkeiten im Bereich von 28°C und 17°C auf, woraus sich verschiedene Aktivierungsenergien und Q_{10}-Werte ergeben. Die Geraden wurden durch lineare Regression von x nach y berechnet.

Bereich von 17°C - 4°C eine Aktivierungsenergie von 115 kJ/Mol (Q_{10}= 5,6) berechnen.

Ein ähnliches Verhalten wurde während der Wiedererwärmung der Rattenleber von 4°C auf 37°C beobachtet.

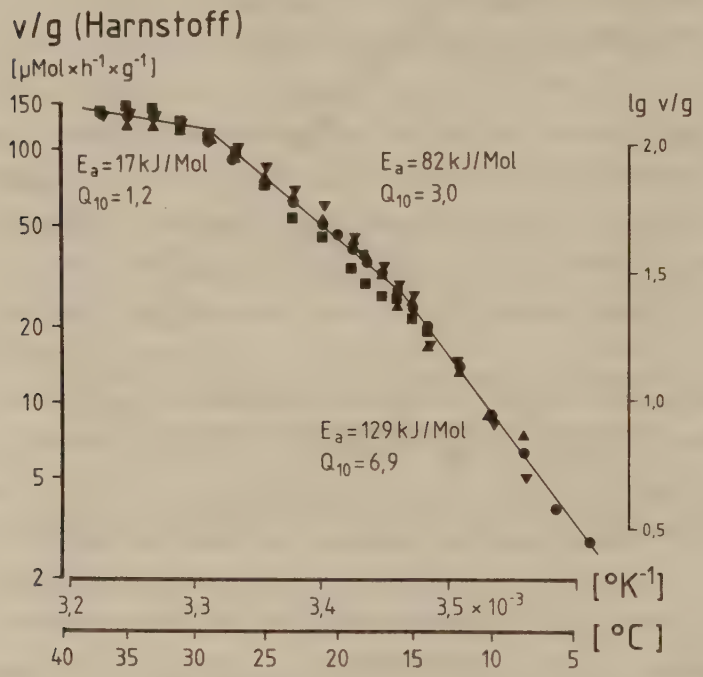


Abb. 21 Die Harnstoffsynthesegeschwindigkeit in der Rattenleber bei Erwärmung von 4°C auf 37°C

Ordinate : Logarithmus der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in µMol/h/g

Abszisse : Reziproke absolute Temperatur in $°K^{-1}$ mit Vergleichsskala in °C

Es läßt sich eine deutliche Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Reaktionstemperatur erkennen, wobei in den Temperaturbereichen von 17°C und 28°C ebenfalls Unstetigkeiten den Geradenverlauf beeinflussen.

Während die "Knickstellen" der Geraden bei Abkühlung und Erwärmung bezüglich der Temperaturbereiche deckungsgleich waren, wiesen die Steigungen und somit die Aktivierungsenergien bei Wiedererwärmung eine geringfügige Erhöhung auf. Die berechneten Werte betrugen im Bereich von 4°C - 17°C 129 kJ/Mol (Q_{10}= 6,9), im Bereich von 17°C - 28°C 82 kJ/Mol (Q_{10}= 3,o) und im Bereich von 28°C - 37°C 17 kJ/Mol (Q_{10}= 1,2). Möglicherweise ist der Grund für die Erhöhung in einem, durch die Kältephase induzierten, gesteigerten Energiebedarf zu suchen.

Die Ursache für die Entstehung der "Knickstellen" ist noch nicht hinreichend geklärt. Da die Harnstoffsynthese in der Leber aus mehreren, hintereinander geschalteten enzymatischen Reaktionsschritten besteht, kann durch den Ausfall oder durch eine Strukturänderung eines geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms bei Unterschreitung einer bestimmten Temperaturschranke die für den Ablauf der enzymatisch katalysierten Reaktion notwendige Aktivierungsenergie erhöht sein (Näheres darüber in Abschnitt 6).

Die einzelnen Daten und Meßwerte aller hypothermen Stoffwechseluntersuchungen sind in Tabelle 2 noch einmal zur Übersicht zusammengefaßt.

Die Regressionsgeraden in den einzelnen Temperaturabschnitten:

Abkühlung: (37°C - 28°C) $\lg v/g = -\frac{558{,}695}{T} + 3{,}877$

(28°C - 17°C) $\lg v/g = -\frac{42o6{,}755}{T} + 16{,}ooo$

(17°C - 4°C) $\lg v/g = -\frac{5988{,}31o}{T} + 22{,}156$

Erwärmung: (4°C - 17°C) $\lg v/g = -\frac{6725{,}48o}{T} + 24{,}72o$

(17°C - 28°C) $\lg v/g = -\frac{426o{,}o72}{T} + 16{,}181$

(28°C - 37°C) $\lg v/g = -\frac{912{,}416}{T} + 5{,}o9o$

lg v/g : Logarithmus der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit pro Gramm Lebergewebe (µMol/h/g)

T : Absolute Reaktionstemperatur (°K)

Je größer der Zähler des Bruches ist, desto größer ist die Temperaturabhängigkeit und desto höher die Aktivierungsenergie und der Q_{1o}-Wert.

Tabelle 2 Hypotherme Stoffwechseluntersuchungen

Versuch	K-H	K-H(+)	v_{max}(A)	v_{max}(E)	Leber	flow(A)	flow(E)
24	17	13	11o	115	8,3	3,9	3,6
25	2o	3o	9o	95	8,8	3,3	3,2
26	25	35	6o	46	9,4	3,1	2,8
27	27	36	1oo	95	1o,6	2,8	2,6
28	25	35	8o	83	1o,6	3,o	2,7
29	26	25	8o	9o	11,o	2,8	2,8
3o	25	45	94	115	12,o	3,1	3,1

Zeichenerklärung:

K-H : Dauer der Auswaschperfusion in min

K-H(+) : Initiale Perfusionsdauer mit Substratzusatz bei 37°C in min

v_{max}(A) : Maximale Produktionsgeschwindigkeit vor Abkühlung in µMol/h/g

v_{max}(E) : Maximale Produktionsgeschwindigkeit nach Erwärmung in µMol/h/g

flow(A) : Perfusionsgeschwindigkeit vor Abkühlung in ml/min/g

flow(E) : Perfusionsgeschwindigkeit nach Erwärmung in ml/min/g

5.2. Konservierungsversuche

Nach Aufklärung der für uns relevanten Stoffwechselkinetik bezüglich der Harnstoffsynthese in der Rattenleber folgt nun in diesem Abschnitt die Darstellung der eigentlichen Thematik der vorliegenden Dissertationsschrift. Wie schon erwähnt, erweist sich die Hypothermie (allgemein durchgeführt in Form von Lagerung des isolierten und hermetisch versiegelten Organs auf Eis in geeigneten Kühlboxen) als eine praktikable Methode zur effektiven Senkung des Sauerstoffverbrauches eines isolierten Organs (GRUNDMANN et al., 1978). Dieser Technik sind jedoch bei Langzeitkonservierungen Grenzen hinsichtlich der Anoxie, der Anhäufung saurer Metaboliten und des physiologischen Ionengleichgewichtes gesetzt; das hierfür verantwortliche Enzym, die Na^+-K^+-ATPase, stellt unterhalb einer Temperatur von 1o°C ihre Aktivität nachweislich ein (MARTIN et al., 1972).
Die daraus resultierende Ionenverschiebung hat einen an Natrium gekoppelten Wassereinstrom in die Zelle zur Folge, was zu einer erheblichen ödematösen Organschwellung führt (siehe auch Abschnitt 2.1.).

Durch exakt gesteuerte Langzeitperfusion mit oxygeniertem Perfusat wurde nun versucht, der Rattenleber auch bei niedrigen Konservierungstemperaturen ein ausreichendes Sauerstoffangebot zu erhalten, durch Abpufferung des Perfusionsmediums den intravasalen pH-Wert

zu stabilisieren und einen Abtransport von sauren Stoffwechselmetaboliten zu gewährleisten. Um die Auswirkung der Ionenverschiebung bei Temperaturen unterhalb von 1o°C auf die Vitalität der Rattenleber untersuchen zu können, wurden Konservierungstemperaturen von 4°C und 11°C gewählt. Weiterhin wurde versucht, durch Verwendung eines hyperosmolaren Perfusionsmediums (Anreicherung mit Mannitol) dem Wassereinstrom in die Leberzellen entgegenzuwirken.

Da die Lufttemperatur innerhalb der Perfusionskammer erheblich höher lag als die des Perfusates, wurde bei allen hypothermen Langzeitversuchen die isolierte Leber zusätzlich noch schwimmend gelagert, um eine gleichmäßige Kälteverteilung auch auf der Leberoberfläche erzielen zu können.

5.2.1. Normoosmolare Langzeitperfusion bei 4°C

In dieser Versuchreihe (Nr. 35, Nr. 47, Nr. 48 und Nr. 49) wurde nach einer initialen Perfusion bei 37°C die Leber schlagartig auf 4°C abgekühlt und mit reduziertem flow unter Verwendung der in 3.3.1. genannten KREBS-HENSELEIT-Elektrolytlösung für eine Dauer von 24 Stunden weiterperfundiert. Anschließend wurde nach Beigabe von Substrat und Stimulantien zum Perfusionsmedium und Erhöhung der Perfusions-Pumpleistung auf den initialen Wert die Leber mit einer Geschwindigkeit

von 3o°C/h wiedererwärmt und während einer finalen Perfusion bei 37°C die Stoffwechselfunktion mittels Messung der Harnstoffsyntheseleistung bestimmt (genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung in Abschnitt 3.6.3.).

Es zeigte sich, daß bei allen Versuchen ca. 2o - 3o Minuten nach der Auswaschperfusion die maximale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit erreicht wurde; die einzelnen Werte lagen bei 115 µMol/h/g (V 35), bei 114 µMol/h/g (V 47), bei 1o6 µMol/h/g (V 48) und bei 93 µMol/h/g (V 49); der initiale flow betrug im Mittel 3,9 ml/min/g. Nach einer 24-stündigen Konservierungszeit zeigten die Lebern bei makroskopischer Betrachtung eine deutlich ausgeprägte Hell-Dunkel-Felderung bei sehr blasser Eigenfärbung und eine mehr oder minder stark ausgeprägte ödematöse Anschwellung, die sich nach anschließender Wiedererwärmung bis auf 37°C zum größten Teil jedoch wieder zurückbildete.

Kurz vor Eintritt der Wiedererwärmungsphase wurde die Lagerungsflüssigkeit in der Organkammer abgelassen, um während der Erwärmung kein Temperaturgefälle zwischen Leberzentrum und -peripherie entstehen zu lassen. Somit konnte auch beobachtet werden, daß sich, wie auch bei allen anderen Langzeitperfusionsversuchen, während Aufwärmung und finaler Perfusion Flüssigkeitsmengen von ca. 1oo - 2oo ml in der Organkammer ansammelten, deren Ursprungslokalisation nicht exakt ermittelt werden konnte. Es läßt sich jedoch vermuten, daß ein Teil der Perfu-

sionsflüssigkeit durch verstärkte intrahepatische Lymphdrainage über die Leberoberfläche ausgeschieden wurde.

Bei drei Versuchen (Nr. 35, Nr. 48 und Nr. 49) wurde die maximale Harnstoffsynthesegeschwindigkeit nach 2o - 4o-minütiger finaler Perfusion bei 37°C erreicht; in einem Versuch (Nr. 47) wurde schon unterhalb einer Temperatur von 37°C die Maximalleistung erlangt, die im Gegensatz zu den anderen Experimenten bei weiterführender Perfusion stark absank und mit 83% bezüglich des initialen Maximalwertes auch die niedrigste Harnstoffsyntheseleistung aufwies (siehe Abbildung 22). Die Werte der anderen Versuche lagen bei 121 µMol/h/g (1o5% der Ausgangsleistung; V 35), bei 13o µMol/h/g (123% der Ausgangsleistung; V 48) und bei 83 µMol/h/g (89% der Ausgangsleistung; V 49); der finale flow betrug im Mittel 3,9 ml/min/g und erwies sich, verglichen mit dem initialen Wert, als konstant.

Die Harnstoffsyntheseleistungen der vier konservierten Rattenlebern während der initialen Perfusion, der Aufwärmphase und der finalen Perfusion sind in Abbildung 22 dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Graphen der einzelnen Versuche als Prozentwertkurven aufgetragen. Als Bezugswert wurde die jeweilige maximale initiale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit (= 1oo%-Wert) gewählt.

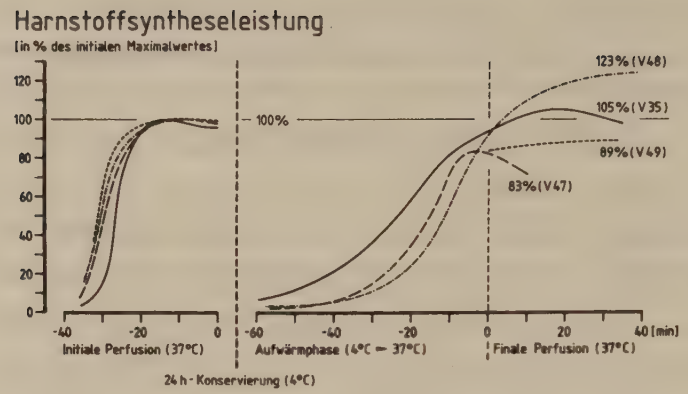


Abb. 22 Die prozentuale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit vier konservierter Rattenlebern nach 24-stündiger normoosmolarer Perfusion bei 4°C

Die Abbildung zeigt die drei wichtigsten Meßphasen der einzelnen Konservierungsversuche:

Initiale Perfusion:

Nach Auswaschung wurden die Lebern ca. 4o min lang mit Substratzusatz bei 37°C perfundiert. Es zeigte sich ein rascher Anstieg der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten bis zum Synthesemaximum (= 1oo%-Wert).

Aufwärmphase:

Nach 24-stündiger normoosmolarer Langzeitperfusion bei 4°C wurden die Lebern mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h wiedererwärmt.

Finale Perfusion:

Nach Aufwärmung wurden die Lebern ca. 4o min lang bei 37°C weiterperfundiert. Es läßt sich erkennen, daß die einzelnen Lebern unterschiedlich hohe Maximalsyntheseleistungen erreichten, die, verglichen mit den initialen Maximalwerten, zwischen 83% und 123% lagen.

Der Durchschnittswert der ermittelten maximalen, finalen Stoffwechselleistungen der einzelnen Rattenlebern lag genau bei 1oo%, was den initialen Syntheseleistungen bezüglich der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit entsprechen würde. Für die in den Versuchen Nr. 35 und Nr. 48 beobachtete gesteigerte Produktionsgeschwindigkeit (über 1oo%) nach 24-stündiger Konservierung konnte keine befriedigende Erklärung gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei, wie schon in Abschnitt 5.1.2. beschrieben, um eine Hyperaktivität der Harnstoffproduktion, verursacht durch die vorausgegangene 24-stündige Stoffwechselinaktivität.

Die genauen Daten der einzelnen Versuche sind in Tabelle 3 noch einmal zur Übersicht zusammengefaßt.

5.2.2. Normoosmolare Langzeitperfusion bei 11°C

Wie in Abschnitt 5.2. schon erwähnt wurde, führt die Inaktivierung des für das intrazelluläre Ionengleichgewicht verantwortlichen Enzyms, die Na^+-K^+-ATPase, unterhalb einer Temperatur von 1o°C zu einer unphysiologischen Organschwellung durch intrazelluläre Wassereinlagerung (GRUNDMANN et al., 1978). In dieser Versuchsreihe (Nr. 38, Nr. 39 und Nr. 4o) wurde nun versucht, durch Perfusion oberhalb dieser Inaktivierungstemperatur den Natriumeinstrom in die Zelle und damit die Ödembil-

dung zu verhindern.

Die Versuchsdurchführung gleicht der in Abschnitt 5.2.1. beschriebenen, wobei hier jedoch eine Konservierungstemperatur von 11°C gewählt wurde.

Die Zeiten, die zur Erreichung der initialen, maximalen Harnstoffsynthesegeschwindigkeit benötigt wurden, sind mit den in 5.2.1. beschriebenen Ergebnissen identisch. Der anfängliche flow betrug in Mittel 3,5 ml/min/g, die einzelnen maximalen Initial-Harnstoffsynthesewerte lagen bei 12o µMol/h/g (V 38), bei 1o9 µMol/h/g (V 39) und bei 81 µMol/h/g (V 4o).

Die Harnstoffsyntheseleistungen der drei konservierten Lebern nach 24-stündiger Perfusion sind als Prozentwertkurven in Abbildung 23 wiedergegeben. Auf eine Eintragung der einzelnen Meßwerte wurde, ebenso wie in Abbildung 22, aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Bei allen drei Versuchen wurde die maximale Harnstoffsynthesegeschwindigkeit nach 1o - 3o-minütiger finaler Perfusion bei 37°C erreicht. Die einzelnen Maximalwerte lagen bei 76 µMol/h/g (64% der Ausgangsleistung; V 38), bei 76 µMol/h/g (7o% der Ausgangsleistung; V 39) und bei 45 µMol/h/g (56% der Ausgangsleistung; V 4o); der finale flow betrug im Mittel 3,3 ml/min/g und war somit bezüglich des initialen Wertes um 4,4% abgesunken. Die Lebern zeigten nach der Aufwärmungsphase immer noch ausgeprägte ödematöse Schwellungen, die sich, im Gegensatz zu den o.g. Perfusionsversuchen bei 4°C, nicht als reversibel erwiesen.

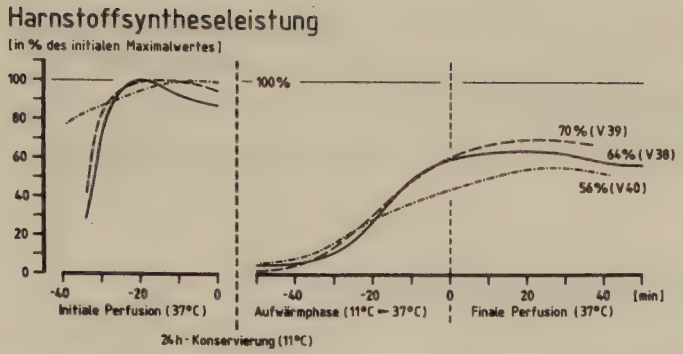


Abb. 23 Die prozentuale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit drei konservierter Rattenlebern nach 24-stündiger normoosmolarer Perfusion bei 11°C

Initiale Perfusion:

Nach Auswaschung wurden die Lebern ca. 4o min lang mit Substratzusatz bei 37°C perfundiert. Mit Ausnahme eines Versuches zeigte sich ein rascher Anstieg der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten bis zum Synthesemaximum (= = 1oo%-Wert).

Aufwärmphase:

Nach 24-stündiger normoosmolarer Langzeitperfusion bei 11°C wurden die Lebern mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h wiedererwärmt.

Finale Perfusion:

Nach Aufwärmung wurden die Lebern 4o - 5o min lang bei 37°C weiterperfundiert. Die dabei erreichten Maximalsyntheseleistungen lagen, verglichen mit den initialen Werten (= 1oo%), zwischen 56% und 7o%.

Der Durchschnittswert der finalen, maximalen Stoffwechselaktivitäten der einzelnen Lebern bezüglich der Harnstoffproduktion lag bei 63% und somit 37% unter den initialen Harnstoffsynthese-Maximalgeschwindigkeiten.

5.2.3. Hyperosmolare Langzeitperfusion bei 4°C

Als eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der intrazellulären Ödembildung wurde vielfach die hypotherme Organkonservierung unter Verwendung hyperosmolarer Elektrolytmedien diskutiert (siehe auch Abschnitt 2.1.). Anlehnend daran wurde in den folgenden Experimenten (Nr. 43, Nr. 44 und Nr. 45) versucht, durch Osmolaritätserhöhung des Perfusionsmediums auf einen theoretischen Wert von 4oo mMol/l (durch Beigabe von 9o mMol/l Mannitol) dem Wassereinstrom in die Leberzellen während den tiefen Konservierungstemperaturen entgegenzuwirken.

Die Versuchsdurchführung wurde bereits in Abschnitt 3.6.3. beschrieben. Sie ist, bis auf die Osmolarität des Perfusionsmediums identisch mit den o.g. Langzeitperfusionen. Die initiale Durchströmungsgeschwindigkeit betrug im Mittel 3,7 ml/min/g, die einzelnen maximalen Initial-Harnstoffsynthesewerte lagen bei 48 µMol/h/g (V 43), bei 114 µMol/h/g (V 44) und bei 86 µMol/h/g (V 45).

Die Versuchsergebnisse der drei konservierten Lebern sind während der Aufwärmphase und der finalen Perfusion als Prozentwertkurven in Abbildung 24 dargestellt.

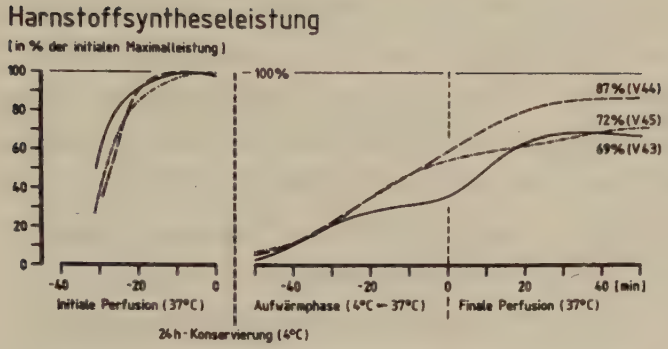


Abb. 24 Die prozentuale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit drei konservierter Rattenlebern nach 24-stündiger hyperosmolarer (4oo mM) Perfusion bei 4°C

Initiale Perfusion:

Nach Auswaschung wurden die Lebern ca. 35 min lang mit Substratzusatz bei 37°C perfundiert. Es zeigte sich bei allen Versuchen ein rascher Anstieg der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten bis zum Synthesemaximum (= 1oo%-Wert).

Aufwärmphase:

Nach 24-stündiger hyperosmolarer Langzeitperfusion bei 4°C wurden die Lebern bei normoosmolarer Perfusion mit Substratzusatz mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h wiedererwärmt.

Finale Perfusion:

Nach Aufwärmung wurden die Lebern ca. 5o min lang bei 37°C weiterperfundiert. Die hierbei erreichten maximalen Harnstoffsyntheseleistungen lagen, verglichen mit den initialen Werten (= 1oo%), zwischen 69% und 87%.

In dieser Versuchsreihe wurde die maximale Harnstoffsynthesegeschwindigkeit nach 3o - 5o-minütiger finaler Perfusion bei 37°C erreicht. Die Maximalwerte der einzelnen Versuche lagen bei 33 µMol/h/g (69% der Ausgangsleistung; V 43), bei 99 µMol/h/g (87% der Ausgangsleistung; V 44) und bei 62 µMol/h/g (72% der Ausgangsleistung; V 45); der finale flow betrug im Mittel 3,4 ml/min/g und ist somit um 9,7% bezüglich des initialen Wertes abgesunken, was sich einer intravasalen Druckerhöhung zuschreiben ließ (siehe auch Abschnitt 5.3.). Wie in Abschnitt 5.2.2. schon beschrieben wurde, zeigten auch hier die einzelnen Lebern nach der Wiedererwärmung eine nichtreversible Schwellung.

Der Mittelwert der einzelnen finalen, maximalen Stoffwechselaktivitäten bezüglich der Harnstoffproduktion lag bei 76% und somit um 24% niedriger als die bei Konservierungsbeginn gemessenen Werte.

In Tabelle 3 sind noch einmal alle Daten und Meßwerte der einzelnen Langzeitkonservierungsversuche zur Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 3 Konservierungsversuche

Versuch	Temp.	Osm.	Lösung	K-H	K-H(+)	Leber	flow(A)	flow(E)	v_{max}(A)	v_{max}(E)	pHP
35	4°C	3o9	K-H	25	35	5,4	3,5	3,5	115	121	1o5%
47	4°C	3o9	K-H	21	39	9,o	3,7	3,7	114	94	83%
48	4°C	3o9	K-H	22	38	8,8	4,3	4,3	1o6	13o	123%
49	4°C	3o9	K-H	33	42	9,2	4,o	4,o	93	83	89%
38	11°C	3o9	K-H	21	39	7,o	3,7	3,6	12o	76	64%
39	11°C	3o9	K-H	2o	4o	8,2	3,3	3,3	1o9	76	7o%
4o	11°C	3o9	K-H	2o	51	8,2	3,3	3,1	81	45	56%
43	4°C	4oo	K-H+Man	27	39	9,8	3,4	2,8	48	33	69%
44	4°C	4oo	K-H+Man	25	35	5,6	3,8	3,8	114	99	87%
45	4°C	4oo	K-H+Man	21	39	5,o	4,o	3,6	86	62	72%

Zeichenerklärung:
- Osm. : Osmolarität des Perfusionsmediums in mMol/l
- K-H : Dauer der Auswaschperfusion in min
- K-H(+) : Perfusionsdauer mit Substrat vor Konservierung in min
- v_{max}(A) : maximale Produktionsgeschwindigkeit vor Konservierung
- v_{max}(E) : maximale Produktionsgeschwindigkeit nach Konservierung
- flow(A) : Perfusionsgeschwindigkeit vor Konservierung in ml/min/g
- flow(E) : Perfusionsgeschwindigkeit nach Konservierung in ml/min/g
- pHp : maximale finale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in Prozent der maximalen initialen Produktionsgeschwindigkeit

5.3. Zusammenfassende Ergebnisbetrachtung

Beim Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen weist die Langzeitperfusion mit KREBS-HENSELEIT-Lösung (3o9 mM) bei einer Temperatur von 4°C signifikant die höchsten finalen Harnstoffproduktionswerte bezüglich der initialen Maximalproduktionsgeschwindigkeiten auf; sie bewegten sich zwischen 83% und 123% (Mittelwert: 1oo%) der initialen Stoffwechselleistungen. Dagegen wurden bei gleicher Versuchsdurchführung - jedoch bei einer Temperatur von 11°C - nur Stoffwechselaktivitäten zwischen 56% und 7o% (Mittelwert: 63%) gemessen, wobei sich auch die Durchflußgeschwindigkeiten (bei konstanter Pumpleistung von Anfang an) bezüglich der initial ermittelten um 4,4% (Mittelwert) verringerten, was sich einer vermehrten ödematösen Leberschwellung mit daraus resultierender Vasokompression zuschreiben ließ.

Die in Abschnitt 5.2.2. beschriebene Theorie zur Verringerung der ödematösen Leberschwellung mittels Perfusion oberhalb des Inaktivierungstemperaturbereiches der Na^+-K^+-ATPase ließ sich somit nicht verifizieren.

Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse der beiden Versuchsreihen ist in Abbildung 25 aufgezeigt. Die Graphen stellen die Mittelwertskurven der in den Abbildungen 22 und 23 gezeigten dar.

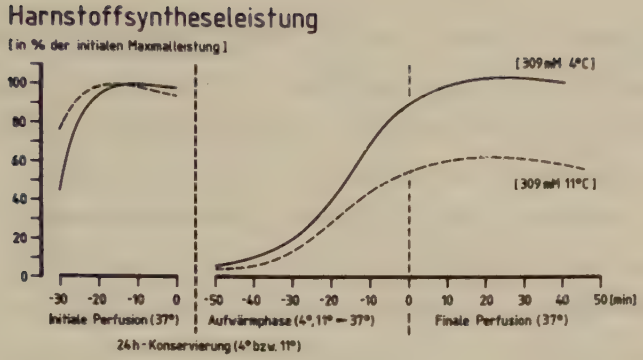


Abb. 25 Die prozentuale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit (Mittelwertskurven) sieben konservierter Rattenlebern nach 24-stündiger normoosmolarer Perfusion bei 4°C bzw. 11°C

Ordinate: prozentuale Harnstoffsyntheseleistung, bezogen auf die maximale initiale Harnstoffproduktion (= 100%-Wert)

Abszisse: Perfusionsdauer in min

Initiale Perfusion bei 37°C:
Nach Auswaschung wurden die Lebern mit K-H-Lösung und Substratzusatz bei 37°C perfundiert, wobei sich ein rascher Anstieg der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten bis zum Synthesemaximum (= 100%-Wert) zeigte.

Aufwärmphase:
Nach 24-stündiger normoosmolarer Langzeitperfusion bei 4°C bzw. 11°C wurden die Lebern unter Substratbeigabe mit einer Geschwindigkeit von 30°C/h wiedererwärmt.

Finale Perfusion bei 37°C:
Die bei 4°C konservierten Lebern erreichten hier wieder ihre initiale Stoffwechselaktivität (= 100%); die bei 11°C konservierten Lebern zeigten signifikant niedrigere Ergebnisse (= 63%).

Auch durch Verwendung der mit Mannitol angereicherten hyperosmolaren KREBS-HENSELEIT-Lösung (4oo mM) bei einer Temperatur von 4°C ließen sich die Versuchsergebnisse, verglichen mit der normoosmolaren Perfusion bei 4°C, nicht verbessern. Die ermittelten finalen Stoffwechselleistungen der einzelnen Lebern lagen zwischen 69% und 87% (Mittelwert: 76%) der initialen Produktionsgeschwindigkeiten; auch die Durchströmungsgeschwindigkeit war bei konstanter Pumpleistung während den 37°C-Plateaus von 3,7 ml/min/g (mittlerer Anfangswert) auf 3,4 ml/min/g (mittlerer finaler Wert), also um 9,7%, abgesunken. Somit ließ sich die in Abschnitt 5.2.3. beschriebene Theorie zur Verringerung des Wassereinstromes in die Leberzellen durch Verwendung eines hyperosmolaren Perfusionsmediums mit Hilfe der osmotisch wirksamen Substanz Mannitol ebenfalls nicht verifizieren.

Verglichen mit den Werten der normoosmolaren Perfusion bei 11°C konnten jedoch durch Konservierung mittels hyperosmolarer Perfusion bei 4°C eindeutig bessere Ergebnisse verzeichnet werden.

Ein Vergleich der Ergebnisse (normoosmolare Perfusion bei 4°C - hyperosmolare Perfusion bei 4°C) ist in Abbildung 26 dargestellt, wobei die gezeigten Graphen die Mittelwertskurven der in den Abbildungen 22 und 24 dargestellten repräsentieren.

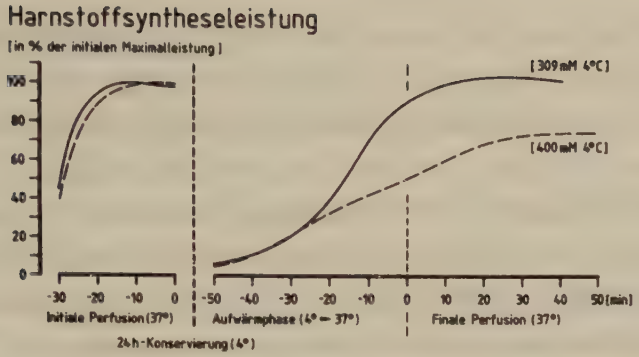


Abb. 26 Die prozentuale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit (Mittelwertskurven) sieben konservierter Rattenlebern nach 24-stündiger normoosmolarer bzw. hyperosmolarer Perfusion bei 4°C

Ordinate: prozentuale Harnstoffsyntheseleistung, bezogen auf die maximale initiale Harnstoffproduktion (= 1oo%-Wert)

Abszisse: Perfusionsdauer in min

Initiale Perfusion bei 37°C:
Nach Auswaschung wurden die Lebern mit K-H-Lösung und Substratzusatz bei 37°C perfundiert, wobei sich ein rascher Anstieg der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten bis zum Synthesemaximum (= 1oo%-Wert) zeigte.

Aufwärmphase:
Nach 24-stündiger normoosmolarer (3o9 mM) bzw. hyperosmolarer (4oo mM) Perfusion bei 4°C wurden die Lebern unter Substratbeigabe mit einer Geschwindigkeit von 3o°C/h wiedererwärmt.

Finale Perfusion bei 37°C:
Die normoosmolar (3o9 mM) konservierten Lebern erreichten hier ihre initiale Stoffwechselaktivität (= 1oo%) wieder; Die hyperosmolar (4oo mM) konservierten Lebern zeigten signifikant niedrigere Ergebnisse (= 76%).

Daß sich die Theorie der hyperosmolaren Organkonservierung bei 4°C jedoch als durchaus berechtigt erweist, zeigen Versuchsergebnisse von KILIAN (1981): er konnte in vier Versuchen, die exakt den hier aufgeführten Versuchsbedingungen und -durchführungen entsprachen, Leberstoffwechselaktivitäten - ebenfalls bezüglich der Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit - nach erfolgter Konservierung zwischen 1o4% und 14o% ermitteln. Als Perfusionsmedium während den 24-stündigen Konservierungsphasen bei 4°C wählte er ein hyperosmolares Perfusat (4oo mMol/l), bestehend aus der schon genannten KREBS-HENSELEIT-Lösung (3o9 mMol/l) und 9o mMol/l Glukose.

6. DISKUSSION

6.1. Der Wert Q_{10} und die Aktivierungsenergie E_a

Die untersuchte Reaktionskinetik der Harnstoffbildung in der Rattenleber zeigt in bestimmten Temperaturbereichen eindeutige Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm, die sich graphisch als "Knickstellen" der sonst linear verlaufenden Geraden manifestieren, wobei es nicht möglich war, zu ergründen, ob es sich hierbei um scharfe oder unscharfe (d.h. fließende) Unstetigkeiten handelt. Daß diese Erscheinung auch bei anderen Intermediärprozessen zu Tage tritt, zeigten Untersuchungen von DIETZ (1978): er konnte in ähnlichen Perfusionsexperimenten mit isolierten Rattenlebern Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm bei der Ketogenese aus Octanoat, CO_2-Produktion aus Octanoat, Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat und Gluconeogenese aus Fructose aufzeigen, wobei die Schärfe dieser Unstetigkeiten ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden konnte. Somit ergeben sich bei der Harnstoffsynthese im ARRHENIUS-Diagramm bezüglich der reziproken absoluten Temperatur (Abszisse) drei Definitionsbereiche - im vorliegenden Falle (umgerechnet auf °C-Skalierung): $\mathbb{D}_1$= 37°C - 28°C, $\mathbb{D}_2$= 28°C - 17°C und $\mathbb{D}_3$= 17°C - 4°C - , in denen jeweils eine spezifische Geradensteigung gilt, und woraus folglich verschiedene Aktivierungsenergien und Q_{10}-Werte resultieren. Da die o.g. Geraden jedoch nur in Bezug auf die reziproke ab-

solute Temperatur, nicht aber auf die Temperatureinteilung in °C linear verlaufen, sind die genannten Q_{10}-Werte nur als Näherungs- bzw. Vergleichswerte zu betrachten. Würde man sie exakt berechnen wollen, so müßte man die hierfür notwendigen Temperaturintervalle (in o.g. Falle betragen diese 1o°C) unendlich klein wählen, und es ergäbe sich somit für jeden Punkt auf der Geraden ein anderer Q_{10}-Wert. Da sich diese Unterschiede nur in den Nach-Komma-Stellen zeigen und keinen Einfluß auf die Konservierungsexperimente ausüben, wurde hier auf diese exakte Berechnung verzichtet.

Die Aktivierungsenergien wurden mit Hilfe der o.g. ARRHENIUS-Gleichung berechnet (siehe 4.2.5.), wobei allerdings in dieser nicht die Reaktionsgeschwindigkeit selbst, sondern die Geschwindigkeitskonstante erscheint. Diese erweist sich aber bezüglich der Geschwindigkeit einer Reaktion nullter Ordnung (bei der die Geschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration wäre) als direkt proportional. In unseren Versuchen wurde durch sehr hoch gewählte Substratkonzentration im Perfusat und durch ständige Substratzufuhr für eine optimale Enzymabsättigung gesorgt (SCHOLZ, 1979) und somit die Bedingungen für eine nahezu konstante maximale Geschwindigkeit geschaffen. Es gilt jedoch zu bedenken, daß eine völlige Substratabsättigung bei einer enzymatischen Reaktion einen Idealfall darstellt, der in der Praxis nicht erreicht werden kann (MÜLLER, 197o).

Da die Harnstoffbildung in der Rattenleber aus mehreren, hintereinander geschalteten, enzymatisch katalysierten Reaktionsschritten besteht, kann die Aktivierungsenergie nur als gültig für die "Über-alles-Reaktion" interpretiert werden, da für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb der Gesamtreaktion die Bedingungen für die Erreichung der Maximalgeschwindigkeit experimentell nicht genügend gesichert sind. Somit müssen die berechneten Aktivierungsenergien mit gewissen Vorbehalten diskutiert werden.

Für die Entstehung der o.g. "Knickstellen" im ARRHENIUS-Diagramm wurden bereits mehrere Theorien erstellt und diskutiert (DIXON und WEBB,1958). DIETZ (1978) wies in seiner Dissertationsschrift (bezogen auf Untersuchungen von KRISTIAKOWSKY und LUMRY, 1949) u.a. auf die Möglichkeit einer reversiblen Inaktivierung von Enzymen hin, wonach in einer enzymatischen Reaktion, bei der ein Enzym mit der inaktiven Form im Gleichgewicht steht, "der Enthalpiewechsel bei der Umwandlung einer Form in die andere dH_c beträgt und das ARRHENIUS-Diagramm eine Gerade zeigt, sobald das Enzym hauptsächlich in der aktiven bzw. in der inaktiven Form vorliegt. Im ersten Fall kann man aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie E_a berechnen und im zweiten Fall E_a-dH_c" (DIETZ, 1978). Es muß jedoch betont werden, daß hierbei lediglich das Temperaturverhalten isolierter Enzyme, nicht aber das ganzer

Reaktionsketten, angesprochen wurde.

Auch darf sicherlich nicht angenommen werden, daß in der Reaktionskette der Harnstoffbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt über den ganzen Temperaturbereich hinweg konstant an eine der Teilreaktionen gebunden bleibt. Vielmehr muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der limitierende Schritt innerhalb der Reaktionskette wechselt, was allein schon die Ausbildung einer Unstetigkeit im ARRHENIUS-Diagramm zur Folge hätte.

Die Harnstoffbildung im Tierkörper ist ein an die Mitochondrienmembran gebundener, enzymatisch katalysierter, zyklischer Vorgang. Untersuchungen von ZIMMERMANN (1981) konnten zeigen, daß Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm nur in Prozessen vorhanden waren, deren Einzelreaktionen von Enzymen gesteuert werden, die zur Mitochondrienmembran assoziiert sind. Somit läßt sich vermuten, daß temperaturbedingte Änderungen der Membranstruktur einen Einfluß auf den Kurvenverlauf im ARRHENIUS-Diagramm besitzen.

Von LUZETTI und HUSSON (1962) wurde die Theorie erstellt, daß der bei einer bestimmten Temperatur beobachtete Wechsel der Aktivierungsenergie möglicherweise mit einem Übergang der Lipidfraktion der Mitochondrienmembran von einem "flüssigen", kristallinen Zustand in einen "festen", gelartigen Zustand zusammenhängt. RAISON et al. (1971) konnten am Beispiel von drei, mit der Mitochondrienmembran assoziierten Enzymsystemen - dem Succinat

Oxidase System, dem Succinat Dehydrogenase System und der Cytochrom c Oxidase von Rattenleber-Mitochondrien - aufzeigen, daß der Wechsel der Aktivierungsenergie mit einer Strukturänderung der Lipidfraktion in der Mitochondrienmembran zusammenhängt, da nach Auflösung der Membran mit Detergentien eine lineare Temperaturabhängigkeit der untersuchten Enzymsysteme resultierte.

Die Bindung der Enzyme an die Membran scheint ein entscheidendes Kriterium für den diskontinuierlichen Verlauf der Geraden im ARRHENIUS-Diagramm zu sein. Enzymsysteme, die zwar intramitochondrial lokalisiert, aber nicht membrangebunden sind - wie die Malatdehydrogenase oder die Monoaminooxidase von Rattenlebermitochondrien - zeigten eine konstante, lineare Temperaturabhängigkeit (RAISON, 1973). Membranassoziierte Enzyme jedoch können aufgrund einer Umstrukturierung des Proteincharakters, hervorgerufen durch eine temperaturbedingte Änderung der Lipidfraktion der Membran (LYONS, 1972; KUMAMATO et al., 1971; RAISON et al., 1971), Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm hervorrufen.

6.2. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} als Vitalitätsparameter

Bei allen von uns durchgeführten Konservierungsversuchen wurden die Lebervitalitäten aus den dazugehörigen maximalen Harnstoffproduktionsgeschwindigkeiten er-

mittelt. Unter normothermen Bedingungen zeigte sich nach der Auswaschphase ein rascher Anstieg der Syntheseleistung, die nach Erreichung eines Maximalwertes zu einem etwas niedriger gelegenen, angedeuteten Plateau wieder abfiel. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei den hypothermen Kurzzeitversuchen nach der Wiedererwärmung beobachtet. Bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Harnstoffproduktion in der Leber erhebt sich nun die Frage, ob die negative Steigung im Definitionsbereich zwischen 37°C und 28°C im ARRHENIUS-Diagramm (Abkühlung) tatsächlich auf eine Temperaturabnahme zurückgeführt werden kann, oder ob dieses Phänomen artifiziell durch die Abnahme der Harnstoffsyntheseleistung nach erreichtem Maximalwert verursacht wurde. Auch die sanfte Steigung im Bereich von 28°C - 37°C bei Wiedererwärmung könnte als nicht durch eine Temperaturzunahme hervorgerufenes Verhalten, sondern als verzögerte Erlangung der Maximalleistung, verursacht durch zu schnelle Erwärmung und zu träger Reaktion des Harnstoffzyklusses auf den Temperaturanstieg, angesehen werden. Es ist somit nicht eindeutig bewiesen, ob die in diesen Bereichen ermittelten Q_{10}-Werte (1,1 - 1,2) die tatsächlichen Verhältnisse wiederspiegeln. Da sich jedoch im Falle eines horizontalen Geradenverlaufes im ARRHENIUS-Diagramm für die Berechnung der Aktivierungsenergie ein Quotient von $0/d(1/T)$ (siehe 4.2.4.) und damit $E_a = 0$ ergeben würden, muß angenommen werden, daß auf alle Fälle eine, wenn auch äußerst geringe, Temperaturabhängigkeit vorliegt.

Eine weitere, interessante Erscheinung bezüglich v_{max} konnte bei den hypothermen Stoffwechseluntersuchungen (siehe 5.1.2.) beobachtet werden: mit Ausnahme von zwei Experimenten wiesen alle Lebern nach kurzzeitiger Abkühlung und anschließender Wiedererwärmung eine um 1o% erhöhte Harnstoffsyntheseleistung (1o4%, 1o5%, 1o6%, 113% und 122% der Maximalwerte vor Abkühlung) auf. Als Ursache hierfür könnte eine intrahepatische Konzentrationserhöhung von Ammoniak, resultierend aus dem Purin- und Pyrimidinabbau untergegangener Hepatozyten, diskutiert werden. Es gilt jedoch zu bedenken, daß alle Versuche bei nahezu maximaler Substratsättigung durchgeführt wurden; somit dürfte eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr bewirken.

Auch eine Steigerung der Mikrozirkulation in der Leber könnte eine verstärkte Harnstoffsynthesegeschwindigkeit zur Folge haben. Im Falle einer reaktiven Vasodilatation und Eröffnung von zuvor verschlossenen Kapillaren würden mehr Hepatozyten mit Substrat versorgt werden. Eine Gefäßerweiterung alleine würde jedoch eine Erniedrigung des Perfusionswiderstandes und damit eine Erhöhung der Durchströmungsgeschwindigkeit bewirken. Unsere Untersuchungen aber bestätigten genau das Gegenteil (siehe Tabelle 2). So müßte vielmehr angenommen werden, daß die größeren Lebergefäße ihre initialen Kaliberwerte nach Erwärmung nicht mehr erreichten, wobei hingegen gleichzeitig das Kapillarnetz verdichtet wurde.

Hieraus würde bei gleichgebliebenem bzw. erhöhtem Strömungswiderstand eine effektivere Perfusion resultieren, die aufgrund der vergrößerten Stoffaustauschfläche eine schnellere Harnstoffproduktion ermöglichen würde.

Alle in dieser Dissertation genannten Vitalitätsparameter sind einzig und allein nur bezüglich der maximalen Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit in der Rattenleber zu interpretieren. Es wurden weder Untersuchungen über die Reversibilität anderer Intermediärprozesse, noch über Zellschädigungen und Gewebsnekrosen vorgenommen. Einen sicheren Rückschluß auf die Vitalität einer konservierten Leber läßt derzeit nur die erfolgreiche Transplantation zu (siehe Einleitung), die der Empfänger mindestens vier Tage überleben muß. Für den Vergleich verschiedener Perfusionslösungen und Konservierungstemperaturen jedoch stellen die o.g. Vitalitätsangaben einen durchaus akzeptablen und aussagekräftigen Bewertungsmaßstab dar, zumal durch die stark vereinfachte Versuchsdurchführung (siehe auch 3.1.) ein Großteil von störenden Einflüssen ausgeschaltet werden konnte.

6.3. Leberzellschwellung und Hyperosmolarität

Hyperosmolare Lösungen intrazellulärer Zusammensetzung (COLLINS- und SACKS-Lösungen) stellen nach dem Stand der gegenwärtigen Literatur (LAMBOTTE, 1978; TOLEDO-PEREYRA,

1979) die geeignetsten Medien zur Organkonservierung dar, wobei die zu konservierenden Organe nicht perfundiert, sondern nach initialer Auswaschperfusion nur schwimmend gelagert wurden. In unseren Experimenten versuchten wir, durch hypotherme Perfusion mit oxygenierter Elektrolytlösung den durch Lagerung nicht gedeckten Sauerstoffverbrauch von 3 - 6% der Norm (GRUNDMANN et al., 1978) der Leber zu gewährleisten. Um den physiologischen Verhältnissen möglichst nahe zu kommen, wurde dazu eine Lösung extrazellulärer Zusammensetzung gewählt (siehe 3.3.), der wir zur Osmolaritätserhöhung zusätzlich noch 9o mM Mannitol beigegeben haben. Die Versuche mit dieser 4oomillimolaren Lösung erbrachten jedoch, verglichen mit der normoosmolaren Konservierung bei 4°C, unerwartet niedrige Ergebnisse. Wird hingegen Mannitol in gleicher Konzentration durch Glukose ersetzt, so ergeben sich signifikant höhere Stoffwechselaktivitäten nach Wiedererwärmung, die sogar noch die Werte der normoosmolaren Konservierungsversuche bei 4°C übertreffen (KILIAN, 1981). Folglich darf mit dem Begriff "Hyperosmolarität" nicht zu pauschal verfahren werden; es gilt immer zu berücksichtigen, mit welcher osmotisch wirksamen Substanz bei welcher Konservierungsmethode und mit welchem Organ gearbeitet wird. Mannitol zeigt als Zugabe zu intrazellulären Elektrolytlösungen (SACKS, 1973) bei der hypothermen Lagerung von Hundenieren durchaus positiv verwertbare Ergebnisse, während bei der hypothermen Rattenleberperfusion ein schwellungshemmender Effekt ausblieb.

Glukose jedoch erweist sich sowohl bei der hypothermen Nierenlagerung unter Verwendung eines Intrazellulärmediums (COLLINS, 1969), als auch bei der hypothermen Rattenleberperfusion mit einem Extrazellulärmedium als osmotisch äußerst wirksame Komponente.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Veränderungen der maximalen Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit zur Beurteilung der Leberfunktion herangezogen. Es ist nicht erwiesen, inwieweit Mannitol als osmotisch wirksames Agens andere Stoffwechselprozesse in der Rattenleber beeinflußt. Durch die Bestimmung von Stoffwechselaktivitäten allein werden sich somit in naher Zukunft sicherlich keine absoluten Angaben über den Funktionszustand einer durch Perfusion konservierten Rattenleber erstellen lassen. Nur die erfolgreiche Transplantation nach Konservierung kann tatsächlichen Aufschluß geben über die Wirksamkeit des Perfusionsmedium und der osmotisch wirksamen Zusätze.

Um ein weiteres Kriterium für die Wirksamkeit des Perfusionsmediums und seiner Zusammensetzung zu finden, wurde versucht, die Organschwellung durch Bestimmung des Feuchtgewichtes nach durchgeführter Konservierung und Vergleich mit dem initial errechneten Lebergewicht zu erfassen, wobei sich in allen Konservierungsversuchen nicht-signifikante Schwellungsfaktoren von 1,2 bis 1,8 fanden. Aufgrund der Streuung dieser Werte und aufgrund der Tatsache, daß schon allein durch den erforderlichen venösen Stauungsdruck (siehe 3.2.1.)

Leberschwellungen bis zu 1,8-fach beobachtet wurden (SCHOLZ, 1967), sind diese Meßwerte für die Beurteilung des Konservierungserfolges nicht herangezogen worden.

Abschließend zum Thema der hypothermen Organperfusion wäre noch zu bedenken, daß ein Organtransport unter Verwendung des o.g. nicht-rezirkulierenden Perfusionsmodells über größere Strecken hinweg ein fast undurchführbares Projekt darstellt. Bei unseren Versuchen wurden für eine 24-stündige Konservierung ca. 1o Liter Perfusat und ca. 16oo Liter Carbogen-Gas (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxyd) verbraucht. Eine menschliche Leber, deren Gewicht etwa das 15o-fache einer Rattenleber beträgt, würde demnach für die adäquate Konservierungsdauer ca. 15oo Liter Perfusat und ca. 24o ooo Liter Carbogen-Gas benötigen, was einer Menge von vierzig 4o-Liter-Gasflaschen entspricht. Es ist somit klar ersichtlich, daß der Transport einer Spenderleber, der aus zeitlichen Gründen per Flugzeug durchgeführt werden würde (wie z.Zt. der Transport von hypotherm gelagerten menschlichen Nieren), ein schier undurchführbares und vor allem zu kostenaufwendiges Verfahren darstellt.

Um dem Perfusionsmodell eine zukunftssichere Stellung im Bereich der Organkonservierung schaffen zu können, muß ein rezirkulierendes Verfahren entwickelt werden, wobei durch Dialyse der pH-Wert konstant gehalten, saure Metabolite abfiltriert, CO_2 absorbiert und Sauer-

stoff und Substrate zugeführt werden müßten. Somit ließe sich die nötige Perfusatmenge auf ein Minimum von einigen Litern beschränken, und der Sauerstoffverbrauch würde sich in realisierbaren Grenzen bewegen. In naher Zukunft jedoch wird sich das Perfusionsmodell gegenüber der einfachen hypothermen Lagerung nicht behaupten können.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurden die Reaktionskinetik der Harnstoffbildung in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber, der Einfluß von Lösungszusätzen auf die maximal erreichbare Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit und verschiedene Perfusionsmedien und -temperaturen im Hinblick auf eine 24-stündige Rattenleberkonservierung. Bei 37°C konnte eine maximale Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit von ca. 15o µMol/h pro Gramm Lebergewebe erreicht werden, die bei Abkühlungs- und Wiedererwärmungsversuchen (37°C - 4°C - 37°C) eine eindeutige Temperaturabhängigkeit zeigte. Dabei wurden Aktivierungsenergien von 11 kJ/Mol bis zu 129 kJ/Mol und Q_{1o}-Werte von 1,1 bis zu 6,9 ermittelt. Hinsichtlich der Rattenleberkonservierung für die Dauer von 24 Stunden wurde bei 4°C und 11°C mit normoosmolarer KREBS-HENSELEIT-Lösung perfundiert. Bezüglich der maximalen Harnstoffproduktionsgeschwindigkeit konnten finale Stoffwechselaktivitäten zwischen 1oo% (normoosmolare Perfusion bei 4°C) und 63% (normoosmolare Perfusion bei 11°C) erreicht werden. Durch Zusatz von 9o mMol/l Mannitol zu dem o.g. Perfusionsmedium wurde bei einer Konservierungstemperatur von 4°C eine Funktionstüchtigkeit der Rattenleber bezüglich der Harnstoffbildung von 76% gemessen.

8. LITERATURNACHWEIS

(1) ABOUNA, G.M.
KOO, C.G.
HOWANITZ, L.F.
ANCARANI, E.
PORTER, K.A.
Successful orthopic liver transplantation after preservation with simple cooling
Transpl. Proc. 3 (1971) 65o

(2) BENICHOU, J.
HALGRIMSON, C.G.
WEIL III., R.
KOEP, L.J.
STARZL, T.E.
Canine and human liver preservation for 6 to 18 hr by cold infusion
Transplantation 24 (1977) 4o7

(3) BRENDEL, W.
MÜLLER, Ch.
REUBEN, H.J.
MESSMER, K.
Elektrolytveränderungen in tiefer Hypothermie
Pflügers Archiv 288 (1966) 22o

(4) BRETTSCHNEIDER, L.
DALOZE, P.
HUGUET, C.
PORTER, K.A.
GROTH, C.G.
KASHIWAGI, N.
HUTCHINSON, D.E.
STARZL, T.E.
The use of combined techniques for extended storage of orthopic liver homografts
Surg. Gynecol. Obstet. 126 (1968) 263

(5) CAHILL, G.F.
ASAMORE, J.
EARLE, A.S.
Glucose penetration into the liver
Amer. J. Physiol. 192 (1958) 491

(6) CALNE, R.Y.
Liver transplantation
Brit. J. Hosp. Med. 1271 (1969)

(7) CALNE, R.Y.
Observation on clinical and experimental liver transplantation
Transpl. Proc. 4 (1972) 773

(8) COLLINS, G.M.
BRAVO-SHUGARMAN, M.
TERASAKI, P.I.
Kidney preservation for transplantation. Initial perfusion and 3o hours ice storage
Lancet 2 (1969) 1219

(9) COREY, E.L.
BRITTON, S.W.
Glycogen levels in the isolated liver perfused with corticoadrenal extract, Insulin and other preparations
Amer. J. Physiol. 131 (1941) 783

(1o) DE MIGUEL, E.
FRESNEDA, V.
GONSALVEZ, M.
SOBERON, R.
MARTINEZ, R.
GARCIA-ROMERO, E.
O'CONNER, F.
CASTOLLO-OLIVARES, J.L.
Pig liver perfusion with membrane oxygenator: a study of liver viability by means of the mitochondrial respiration test
J. surg. Res. 17 (1974) 186

(11) DIETZ, H.-G.
Temperaturabhängigkeit von Stoffwechselgrößen in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
Dissertation, München (1978) LMU

(12) DIXON, M.
WEBB, E.C.
Enzymes
Longmans, Green & Co.; London, New York, Toronto (1958)

(13) DOBBS, B.R.
LEE, D.
The effect of purification of commercial bovine serum albumine on the performance of isolated rat livers perfused at 5°C
Cryobiology 16 (1979) 461

(14) GRUNDMANN, R.
STRÜMPER, R.
KÜRTEN, K.
BISCHOFF, A.
PICHLMAIER, H.
Nierenkonservierung durch hypotherme Lagerung nach Collins und Sacks: Der Einfluß von 0 - 3o Minuten warmer Ischämie auf die erreichbare Konservierungszeit
Langenbecks Arch. Chir. 346 (1978) 11 - 24

(15) HAGEMANN, E.
SCHMIDT, G.
Ratte und Maus; Versuchstiere in der Forschung
Walter de Gruyter & Co. (196o)

(16) KILIAN, N.
Persönliche Mitteilung aus noch nicht vollendeter Dissertation
München (1981) LMU

(17) KÖHLER, O.
Persönliche Mitteilung
(1979)

(18) KREBS, H.A.
HENSELEIT, K.
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Z. Physiol. Chem. 21o (1932) 33

(19) KRISTIAKOWSKY, G.B.
LUMRY, R.J.
Anomalous temperature effects in the hydrolysis of Urea by Urease
Jacs 71 (1949) 2oo6

(2o) KUMAMOTO, J.
RAISON, J.K.
LYONS, J.M.
Temperature "breaks" in ARRHENIUS plots: A thermodynamic consequence of a phase change.
J. theor. Biol. 31 (1971) 47

(21) LAMBOTTE, L.
WOJCIK, S.
PONTEGNIE-ISTACE, S.
Investigations on the mechanisms of action of hyperosmolar intracellular solutions used in liver preservation
Organ Preservation II, Cap. 24 (1978) 292

(22) LATSCHA, H.P.
KLEIN, H.A.
Chemie für Mediziner
Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York (1977)

(23) LIE, T.S.
KÄUFER, Ch.
STEDEK, M.
PRANGE, C.H.
ROMMELSHEIM, K.
FILIMANN, B.
GÜTGEMANN, A.
Verlängerte ischämische Toleranzzeit der menschlichen Leber mit erfolgreicher Transplantation
Münch. med. Wschr. 116 (1974) 1o13

(24) LUZETTI, V.
HUSSON, F.
The structure of the liquid-cristalline phase of lipid water systems
J. Cell. Biol. 12 (1962) 2o7

(25) LYONS, J.M.
Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperatures
Cryobiology 9 (1972) 341

(26) MARTIN, D.R.
SCOTT, D.F.
DOWNES, G.L.
BELZER, F.O.
Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation
Ann. Surg. 175 (1972) 111

(27) MATTENHEIMER, H.
Die Theorie des enzymatischen Tests
Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica (1976)

(28) MILLER, L.L.
BLY, C.G.
WATSON, M.L.
BALE, W.F.
The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-e-C14
J. expt. Med. 94 (1951) 431

(29) MÜLLER, W.
Zur Ermittlung kinetischer Parameter und deren Temperaturverhalten bei der Hydrolyse von Ribonukleinsäure und cyclischem Cytidin-2',3'-Phosphat durch Ribonuklease
Dissertation, München (197o) TU

(3o) PONTEGNIE-ISTACE, S.
LAMBOTTE, L.
Liver adenine nucleotide metabolism during hypothermic anoxia and a recovery period in perfusion
J. Surg. Research 23 (1977) 339

(31) RAISON, J.K.
LYONS, J.M.
THOMSON, W.W.
The influence of membranes on the temperature induced changes in the kinetics of some respiratory enzymes of mitochondria.
Arch. Biochem. Biophys. 142 (1971) 83

(32) RAISON, J.K. Temperature induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulations Proc. Soc. Exp. Biol. (zitiert nach: LYONS, J.M. (1972) Cryobiology 9 341) (1973)

(33) SACKS, S.A.
PETRISCH, P.H.
KAUFMAN, J.J. Canine kidney preservation using a new perfusate Lancet 1 (1973) 1o24

(34) SCHIMASSEK, H. Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic medium and control of liver function Live Sciences 11 (1962) 629

(35) SCHOLZ, R.
BÜCHER, Th. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. Control of energy metabolism
Ed. B. Chance Academic Pr. N.Y. (1965) 393

(36) SCHOLZ, R. Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung
Habilitationsschrift (1967)

(37) SCHOLZ, R.
HANSEN, W.
THURMAN, R.G. Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic process. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver
Europ. J. Biochem. 38 (1973) 64

(38) SCHOLZ, R. Persönliche Mitteilung (1979)

(39) SUNG, D.T.W.
WOODS, J.E.
Forty-eight hour preservation of the canine liver
Ann. Surg. 179 (1974) 422

(4o) TOLEDO-PEREYRA, L.H.
CHEE, M.
LILLEHEI, R.C.
CONDIE, R.M.
Liver preservation by cold storage with hyperosmolar solutions for twenty-four hours
Cryobiology 16 (1979) 43

(41) TROWELL, O.A.
Urea formation in the isolated perfused liver of the rat
J. Physiology 1oo (1942) 432

(42) WARBURG, O.
Chemische Konstitution von Fermenten
Erg. Enzymforschung 7 (1938) 21o

(43) WILLIAMS, J.A.
WOODSBURY, D.M.
Determination of extracellular space and intracellular electrolytes in rat liver in vivo
J. Physiol. 212 (1971) 85

(44) ZIMMER, P.
Der Malat-Aspartat-Zyklus: ein Mechanismus für den Transport von reduzierten Äquivalenten zwischen Zytosol und Mitochondrien
Dissertation, München (1973) LMU

(45) ZIMMERMANN, F.A.
CALNE, R.Y.
McMASTER, P.
WILLIAMS, R.
Thirty human livers preserved by simple hypothermia and transported for orthotopic grafting
in: Organpreservation, Ed. Pegg, D.E. and Jacobsen, I.B.A. Churchill Livingstone Edinburgh (1979)

(46) ZIMMERMANN, F.A.
Experimentelle Untersuchungen zur Organkonservierung und der Immunantwort bei der orthotopen Lebertransplantation
Habilitationsschrift (1981)

Dankvermerk

Meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. med. F.A. Zimmermann, danke ich sehr für die Überlassung des Themas, für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Studien und für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. W.Ch. Hecker danke ich ebenfalls sehr für die Durchsicht meiner Arbeit und für die Möglichkeit, in seinen Laboratorien arbeiten zu können.

Großen Dank bringe ich Herrn Dr. med. H.-G. Dietz entgegen, der sich durch seine unermüdliche Hilfeleistung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche als unentbehrlicher Rettungsanker erwies.

Meinem Freund und Mit-Doktorand Norbert Kilian danke ich sehr für die Beschaffung der Literatur und zuverlässige Zusammenarbeit bei den Versuchsvorbereitungen und -durchführungen.

Eine große Unterstützung verdanke ich Frau S. Dorn-Kling, ohne deren organisatorischer Hilfe und medizinisch-technischen Fähigkeiten diese Arbeit nur bedingt durchführbar gewesen wäre.

LEBENSLAUF

Ich, Joachim Friedrich Romuald Kosterhon, wurde am 2. August 1957 in Landshut/Ndb. als erster Sohn des Reg. Amtmannes Romuald Kosterhon und dessen Ehefrau Ursula Kosterhon, geb. Müller, geboren.

Nach dem Grundschulbesuch von 1963 bis 1967 in der Katholischen Knabenvolksschule St. Nikola Landshut folgte eine neunjährige naturwissenschaftliche Ausbildung am Hans-Leinberger-Gymnasium in Landshut. Im Mai 1976 legte ich die Prüfung zur allgemeinen Hochschulreife ab.

Am 1. Juli 1976 wurde ich als Sanitätssoldat in das Gebirgssanitätsbataillon 8 in Murnau/Obb. zum Wehrdienst eingezogen. Am 1. Oktober 1976 erfolgte die Versetzung zur Krankenpflegeschule des Bundeswehrkrankenhauses Amberg/Opf.. Nach Absolvierung des Krankenpflegehelferlehrganges wurde ich im Januar 1977 als Sanitätsoffiziersanwärter in das Dienstverhältnis eines Soldaten auf Zeit übernommen und nach München zur Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr kommandiert.

Im Sommersemester 1977 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Medizin. Nach vier Semestern legte ich das Physikum, nach weiteren zwei Semestern den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Im September 1979 begann ich mit den ersten experimentellen Studien für meine Inaugural-Dissertation an der

Kinderchirurgischen Klinik der Universitäts-Kinderklinik München im Dr. von Hauner'schen Kinderspital. Im Juli 1981 konnten die experimentellen Untersuchungen zum Abschluß gebracht werden und im September 1981 die ersten Entwürfe eingereicht werden. Die endgültige Fertigstellung der Dissertationsschrift erfolgte im Juni 1982.

Den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolvierte ich im März 1983. Im nachfolgenden Praktischen Jahr war ich an der Staatl. Orthopädischen Klinik in München und am Städt. Krankenhaus in Landshut (Innere Medizin und Chirurgie) tätig.